



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN PATOLOGIA CLINICA

**PROFILO DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA *LET-7G* E
MIR-21 IN UNA SERIE DI CARCINOMI NON A PICCOLE
CELLULE DEL POLMONE**

Relatore

Prof.ssa Gabriella Fontanini

Candidato

Dott.ssa Alessandra Capodanno

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

RIASSUNTO

Il carcinoma del polmone comprende un gruppo molto eterogeneo di tumori di cui il carcinoma non a piccole cellule del polmone (NSCLC) rappresenta circa l'80% dei casi. Nonostante i progressi ottenuti sia nelle procedure diagnostiche che negli approcci terapeutici, il carcinoma del polmone rappresenta la prima causa di morte per neoplasia nei paesi Occidentali con tassi di ricorrenza molto elevati anche negli stadi precoci. Negli ultimi anni, la scoperta dei microRNA ha messo in luce un nuovo meccanismo di regolazione post-trascrizionale che interviene in processi cellulari fondamentali, quali il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi e la risposta ai segnali extracellulari. I microRNA, inoltre, svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi e nella progressione di numerose neoplasie umane, incluso il carcinoma del polmone.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare mediante *Real-time* PCR, utilizzando degli specifici TaqMan[®] microRNA *assays*, il profilo di espressione di due microRNA, *Let-7g* e *miR-21*, in una serie di 80 pazienti con NSCLC al fine di stabilirne una loro eventuale de-regolazione, di identificare possibili relazioni tra la loro espressione e le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, e di valutarne un loro eventuale impiego come marcatori diagnostici, prognostici e predittivi.

Confrontando il profilo di espressione delle forme mature dei microRNA analizzati in questo studio negli 80 pazienti con NSCLC e in una serie di 27 tessuti polmonari normali, abbiamo evidenziato una significativa over-espressione di *miR-21* nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali ($p < 0.0001$), mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per l'espressione di *Let-7g*.

Al fine di verificare se esistessero delle correlazioni tra le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti ed il profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21*, i tumori sono stati classificati in base al valore mediano del *fold change* in tumori ad alta e bassa espressione per i due microRNA. L'analisi statistica non ha evidenziato la presenza di alcuna associazione significativa tra l'espressione relativa di *Let-7g* o *miR-21* e le principali variabili clinico-patologiche, quali l'età, il sesso, l'abitudine al fumo, le dimensioni del tumore, ed i diversi tipi di NSCLC, sebbene il rapporto di espressione sia risultato sempre a favore degli adenocarcinomi rispetto ai carcinomi squamosi. Al contrario, una relazione statisticamente significativa ($p = 0.046$) è stata osservata tra

l'espressione di *Let-7g* e lo stato linfonodale dei pazienti alla diagnosi, supportando un importante ruolo di *Let-7g* come microRNA oncosoppressore.

Dal momento che i microRNA esplicano la loro funzione biologica mediante la regolazione di specifici geni *target*, per poter attribuire un significato biologico ai dati di espressione osservati per *Let-7g* e *miR-21* abbiamo eseguito un'analisi *in silico* utilizzando dei metodi bio-informatici che hanno portato all'identificazione di 24 potenziali geni bersaglio per *Let-7g*, tra cui *HMGA2*, *N-RAS*, *ERCC6* e *MAP3K3*, e 26 possibili geni bersaglio per *miR-21*, tra cui *PDCD4*, *WWP1*, *MSH2*, *CCL1* e *MALT1*.

L'analisi delle correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras*, le cui frequenze di mutazione sono risultate essere pari rispettivamente a 29.5% e 20.5%, ha messo in evidenza una relazione altamente significativa ($p=0.0003$) tra lo *status* del gene *K-Ras* e l'espressione di *miR-21*, che è risultata notevolmente più elevata nei pazienti che presentavano mutazioni del gene *K-Ras* rispetto a quelli *wild type* (*Fold change*: 14.237 ± 1.638 vs 7.316 ± 0.792).

Infine, abbiamo eseguito un'analisi di sopravvivenza al fine di stabilire un possibile ruolo prognostico e predittivo di *Let-7g* e *miR-21* nei pazienti con NSCLC. Analizzando la sopravvivenza dei pazienti con NSCLC mediante il metodo di Kaplan-Meier, non abbiamo riscontrato differenze significative nell'intervallo libero da malattia e nella sopravvivenza globale in relazione all'età, sesso, dimensioni del tumore, stato linfonodale, abitudine al fumo, o al profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21*, mentre una relazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra questi due parametri di sopravvivenza e l'istologia, il *performance status* e la risposta alla terapia con inibitori delle tirosin-chinasi. Restringendo l'analisi di sopravvivenza ai primi 30 mesi del *follow-up*, abbiamo riscontrato che i pazienti con tumori con alti livelli di espressione di *Let-7g* o di *miR-21* hanno mostrato una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto ai pazienti a bassa espressione di tali microRNA sia per quanto riguarda la lunghezza degli intervalli di tempo liberi da malattia e che la sopravvivenza globale.

In conclusione, i nostri risultati hanno messo in evidenza un possibile ruolo diagnostico e prognostico per la concomitante valutazione delle mutazioni del gene *K-Ras* e dei profili di espressione di *Let-7g* e di *miR-21* che potrebbe svolgere un ruolo importante nell'identificazione dei pazienti con un rischio più elevato di recidiva e a prognosi peggiore.

ABSTRACT

Lung cancer is the most common cause of cancer-related death worldwide and non small cell lung cancer (NSCLC) accounts for about 80% of all the lung cancers. Despite potentially curative surgery and tumor markers greatly improved diagnosis, about 40% of the patients will relapse within 5 years.

Recently, a central role in cancer development has been established for microRNA. microRNA are a group of highly evolutionarily conserved non coding RNA that modulate protein expression by regulating translational efficiency or cleavage of their target mRNA. miRNA have been shown to play a key role in the regulation of known oncogenes and tumor suppressor genes and essential cellular processes, including cell proliferation, growth, differentiation, apoptosis, and angiogenesis. Moreover, aberrant microRNA expression has been shown to be associated with many types of cancers, including NSCLC.

The aim of this study was to evaluate the expression profile of microRNA *Let-7g* and *miR-21* in a series of 80 patients with NSCLC and to correlate it with the main clinico-pathological features, mutational status of *EGFR* and *K-Ras* genes, and prognosis.

In order to evaluate the involvement of the selected microRNA in NSCLC, total RNA from 80 NSCLC patients and 27 normal lung tissues was profiled by Real-time PCR using specific TaqMan[®] microRNA assays for the mature form of *Let-7g* and *miR-21*.

Our data showed that the *miR-21* expression was significantly higher in tumor tissues than in normal lung tissues ($p<0.0001$), while no significant alterations were observed for the expression of *Let-7g*.

To evaluate whether microRNA expression was associated with the main clinico-pathological features of the NSCLC patients, tumors were classified as low- and high-expressor tumors on the basis of the median value of the fold change. No statistical association was observed between *Let-7g* or *miR-21* expression and the main clinico-pathological characteristics of the patients, including age at the diagnosis, gender, histology, tumor size, or smoking habit. However, although no statistically significant both *Let-7g* and *miR-21* microRNAs were down-regulated in squamous cell carcinomas respect adenocarcinomas. Moreover, we showed a significant relationship ($p=0.046$)

between the low *Let-7g* expression and the presence of positive lymph nodes at the diagnosis, sustaining an important role of *Let-7g* as tumor suppressor microRNA.

In order to identify the genes whose expression might be regulated by *Let-7g* and *miR-21*, we performed a bioinformatics analysis by publicly available algorithms. This analytical approach led to the identification of 24 putative target genes for *Let-7g*, such as *HMGA2*, *N-RAS*, *ERCC6* or *MAP3K3* genes, and 26 target genes for *miR-21*, such as *PDCD4*, *CCL1*, *WWP1*, *MSH2* or *MALT1* genes.

In our study, genomic profiling of NSCLC patients showed that *EGFR* and *K-Ras* mutations were mutually exclusive and mutation frequency was 29.5% and 20.5%, respectively. Interestingly, among the NSCLC patients high level of *miR-21* expression was significantly correlated with the *K-Ras* status ($p=0.0003$), with higher expression of this microRNA in the *K-Ras* mutant patients than wild type ones (Fold change: 14.237 ± 1.638 vs. 7.316 ± 0.792).

Finally, we performed a survival analysis in order to establish whether the expression of *Let-7g* and *miR-21* could have any impact on prognosis of the NSCLC patients treated with the tyrosine-kinase inhibitors. Survival analysis by Kaplan-Meier method showed a highly significant correlation between disease free survival or overall survival and the performance status of the NSCLC patients, the response to the treatment with the tyrosine-kinase inhibitors, and the different histotype of NSCLC, but failed to show any significant correlation with *Let-7g* or *miR-21* expression or the main clinico-pathological features. Interestingly, when we further restricted the observation window to 30 months from diagnosis, we found that NSCLC patients with a high *Let-7g* and *miR-21* expression showed a highly significant lower survival rate both in terms of disease free survival and overall survival.

In conclusion, our data indicate that *Let-7g* and *miR-21* profiling in conjunction with the determination of *K-Ras* mutational status may be considered as a useful diagnostic and prognostic biomarker in NSCLC allowing to identify the patients at high risk of disease recurrence and poor outcome.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. Carcinoma del polmone	1
1.1 Epidemiologia e fattori di rischio	1
1.2 Classificazione istologica	4
1.3 Strategie terapeutiche nei carcinomi del polmone	7
1.4 Caratterizzazione biomolecolare dei carcinomi del polmone	9
1.4.1 Mutazioni del gene <i>EGFR</i>	10
1.4.2 Mutazioni del gene <i>K-Ras</i>	12
1.4.3 Mutazioni del gene <i>HER-2</i>	14
1.4.4 Riarrangiamenti del gene <i>ALK</i>	14
1.4.5 Mutazioni del gene <i>c-Met</i>	16
2. I microRNA	17
2.1 Biogenesi dei microRNA	19
2.2 Regolazione post-trascrizionale mediata dai microRNA	21
2.3 Predizione bioinformatica dei <i>target</i> molecolari dei microRNA	22
2.4 Regolazione dell'espressione dei microRNA	23
2.5 Ruolo dei microRNA nelle neoplasie umane	25
2.6 Ruolo dei microRNA nei carcinomi del polmone	30
2.6.1 I microRNA come marcatori diagnostici nel carcinoma del polmone	31
2.6.2 I microRNA come marcatori prognostici nel carcinoma del polmone	33
2.6.3 I microRNA come marcatori predittivi nel carcinoma del polmone	33
SCOPO DELLA TESI	35
MATERIALI E METODI	36
1. Selezione dei pazienti e caratteristiche dei tumori	36
2. Analisi dell'espressione dei microRNA	37
2.1 Estrazione e purificazione dell'RNA	37
2.2 Analisi dell'espressione dei microRNA	39
2.2.1 Retrotrascrizione dei microRNA	40

2.2.2	<i>Quantificazione dei microRNA mediante Real-time PCR</i>	40
2.2.3	<i>Predizione bioinformatica dei target di microRNA</i>	42
3.	Analisi genetica	43
3.1	Estrazione e purificazione del DNA	43
3.2	Analisi mutazionale del gene <i>EGFR</i>	44
3.2.1	<i>Amplificazione del gene EGFR mediante PCR</i>	44
3.2.2	<i>SSCP</i>	45
3.2.3	<i>Sequenziamento genomico diretto</i>	47
3.3	Analisi mutazionale del gene <i>K-Ras</i>	49
3.3.1	<i>Amplificazione dei codoni 12 e 13 del gene K-Ras</i>	49
3.3.2	<i>Pirosequenziamento</i>	50
3.3.3	<i>Amplificazione del gene K-Ras mediante PCR</i>	53
4.	Analisi statistica	53
	RISULTATI	54
1.	Profilo di espressione di <i>Let-7g</i> e <i>miR-21</i> nei NSCLC	54
2.	Correlazioni dell'espressione di <i>Let-7g</i> e <i>miR-21</i> con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC	55
3.	Predizione dei geni <i>target</i> di <i>Let-7g</i> e <i>miR-21</i>	58
4.	Analisi genetica	59
4.1	Analisi mutazionale del gene <i>EGFR</i>	60
4.2	Analisi mutazionale del gene <i>K-Ras</i>	64
4.3	Correlazioni tra lo <i>status</i> mutazionale dei geni <i>EGFR</i> e <i>K-Ras</i> e le variabili clinico-patologiche	67
4.4	Correlazioni tra lo <i>status</i> mutazionale dei geni <i>EGFR</i> e <i>K-Ras</i> ed i profili di espressione di <i>Let-7g</i> e <i>miR-21</i>	69
5.	Analisi di sopravvivenza	70
	DISCUSSIONE	77
	BIBLIOGRAFIA	89

INTRODUZIONE

1. Carcinoma del polmone

I polmoni rappresentano la sede di una grande varietà di neoplasie sia primitive, che si originano dai tessuti epiteliali che compongono i bronchi e il parenchima polmonare, sia secondarie, costituite da metastasi di neoplasie che si originano in altri organi, quali ad esempio il rene, il fegato, la mammella e la prostata [1,2].

La maggior parte dei casi di carcinoma del polmone sono diagnosticati in una fase avanzata della malattia, in quanto la diffusione a distanza di questa neoplasia avviene in una fase precoce della sua evoluzione. Infatti, meno di un quinto dei carcinomi del polmone sono diagnosticati quando il tumore è ancora confinato al polmone ed anche in questi casi con un'aspettativa di vita potenzialmente migliore, la prognosi rimane infausta con un tasso di sopravvivenza globale a 5 anni dalla diagnosi inferiore al 15%. La diffusione a distanza del carcinoma polmonare può avvenire sia per via linfatica che per via ematica e le sedi di metastatizzazione più frequenti sono rappresentate dalle ghiandole surrenali, interessate in più della metà dei casi, dal fegato (30-50% dei casi), dall'encefalo (20% dei casi) e dalle ossa (20% dei casi) [1-3].

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

Nei paesi Occidentali, il carcinoma del polmone rappresenta la neoplasia con il maggior tasso di incidenza dopo il carcinoma della prostata nell'uomo ed il carcinoma della mammella nella donna e costituisce la prima causa di morte per neoplasia in entrambi i sessi (**Figura 1**). È stato stimato che nel mondo ogni anno vengono diagnosticati 1.2 milioni di nuovi casi di carcinoma del polmone e che in circa il 90% dei casi il decesso avviene entro i 5 anni dalla diagnosi indipendentemente dal sesso e dalla razza [1-3].

Il carcinoma polmonare è tipicamente una malattia dell'età avanzata, dal momento che soltanto il 2% dei casi si manifesta prima dei 40 anni di età. Il picco massimo di incidenza si manifesta tra la V e la VII decade di età e ciò rende ancora più difficile il trattamento di una patologia già di per sé complessa e per la quale le terapie attualmente disponibili presentano una limitata efficacia [1-3].

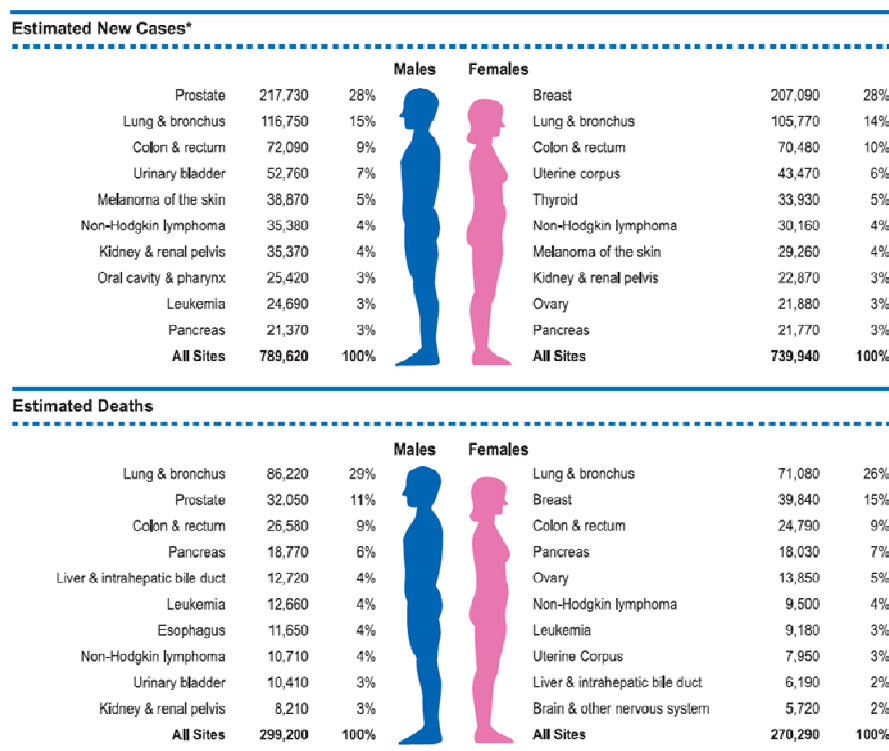


Figura 1. Incidenza e mortalità delle principali neoplasie umane

Il carcinoma del polmone si riscontra con maggiore frequenza nel sesso maschile, sebbene con il diffondersi dell'abitudine al fumo nel sesso femminile questa differenza si stia riducendo sempre di più, con un rapporto attuale tra maschi e femmine di circa 2.5 a 1. Negli ultimi 30 anni per effetto delle campagne contro il fumo, si è assistito ad una significativa riduzione del tasso di mortalità per carcinoma polmonare in relazione all'età nel sesso maschile, mentre il tasso di mortalità nel sesso femminile risulta tutt'ora in aumento per effetto a distanza dell'aumento del fumo di sigaretta nella popolazione femminile [1-3].

Il carcinoma del polmone è una patologia che presenta un'eziologia molto eterogenea in cui un ruolo fondamentale è svolto da fattori ambientali, quali il fumo di sigaretta e l'esposizione professionale a varie sostanze [1-3].

Il principale fattore di rischio associato al carcinoma del polmone è il **FUMO DI TABACCO**, la cui correlazione con le neoplasie polmonari è stata dimostrata da numerosi studi epidemiologici e clinici. Infatti, diversi studi presenti in letteratura hanno messo in evidenza una stretta associazione tra lo sviluppo del carcinoma polmonare e il numero di sigarette giornaliere, la tendenza ad aspirare il fumo e la durata dell'abitudine

al fumo. Un fumatore medio ha un rischio 10 volte maggiore di sviluppare un carcinoma del polmone rispetto ad un non fumatore e tale rischio è di almeno 20 volte superiore nei forti fumatori che consumano più di 40 sigarette al giorno. Molte delle 1200 sostanze individuate nel fumo di tabacco sono, infatti, potenziali carcinogeni ed includono sia agenti iniziatori, come gli idrocarburi aromatici policiclici, che agenti promotori della trasformazione neoplastica, come i derivati del fenolo. Nel fumo di sigaretta, inoltre, sono stati riscontrati anche elementi radioattivi, quali ad esempio il polonio-210, il carbonio-14 ed il potassio-40, e contaminanti come l'arsenico ed il nichel [1-3].

Le evidenze cliniche che dimostrano la correlazione tra il fumo di sigaretta e l'insorgenza del carcinoma polmonare si basano sulla presenza nei fumatori di alterazioni dell'epitelio bronchiale, quali la perdita delle ciglia vibratili, l'iperplasia delle cellule basali e la presenza di cellule atipiche con nuclei ipercromatici. Globalmente è stato stimato che circa l'85% dei casi di carcinomi del polmone si verificano nei soggetti fumatori, mentre in circa il 10% dei casi questa neoplasia insorge in pazienti che non hanno mai fumato. Dal punto di vista clinico, i non fumatori che sviluppano la malattia sono più frequentemente donne con un'età media più bassa rispetto ai fumatori e presentano una prognosi migliore [1-3].

Per quanto riguarda invece l'esposizione professionale, un notevole aumento dell'incidenza di carcinoma polmonare è stata dimostrata in soggetti esposti ad **ASBESTO**, **CROMO**, **NICHEL**, **ARSENICO** e, soprattutto, a **RADIAZIONI IONIZZANTI**, in particolare dell'**URANIO** e del **RADON**, che causano alterazioni genetiche a livello delle cellule polmonari che accumulandosi portano all'insorgenza del fenotipo neoplastico. Ad esempio, un aumento dell'incidenza di cancro del polmone è stato riscontrato tra i sopravvissuti agli eventi nucleari di Hiroshima e Nagasaki e fra i minatori esposti all'uranio, in cui il rischio di sviluppare questa neoplasia è 4 volte più elevato nei non fumatori che nella popolazione generale e 10 volte nei fumatori. Inoltre, l'esposizione al radon, un gas inodore derivante dai processi di decadimento del radio e presente nell'ambiente domestico induce mutazioni a carico del DNA ed aumenta notevolmente il rischio di trasformazione maligna. Nonostante la mancanza di studi definitivi, alcuni studiosi attribuiscono a questo insidioso cancerogeno la maggior parte dei casi di neoplasie polmonari insorte nei non fumatori in seguito all'inalazione e alla deposizione

a livello dei bronchi dei prodotti di degradazione radioattivi che rimangono sospesi nell'ambiente [1-3].

1.2 Classificazione istologica

I carcinomi del polmone vengono classificati dal punto di vista istologico in due grandi categorie che presentano notevoli differenze sia per quanto riguarda gli aspetti terapeutici che gli aspetti prognostici, il **CARCINOMA A PICCOLE CELLULE DEL POLMONE (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*)** ed il **CARCINOMA NON A PICCOLE CELLULE DEL POLMONE (NSCLC, *Non Small Cell Lung Cancer*)**, il quale a sua volta è classificato in tre principali sottotipi istologici: l'adenocarcinoma, il carcinoma a cellule squamose ed il carcinoma a grandi cellule del polmone [1,2].

Il **SCLC** o **MICROCITOMA** è una neoplasia polmonare che origina dalle cellule neuroendocrine dei grossi bronchi e rappresenta circa il 20% dei casi di carcinoma del polmone. Il SCLC insorge preferenzialmente in sede ilare o centrale con un ampio coinvolgimento del mediastino e si sviluppa prevalentemente in sede sotto-mucosale. Questo tipo di neoplasia polmonare è caratterizzato dalla presenza di cellule caratteristiche, generalmente di piccole dimensioni, di forma rotondeggiante o ovalare (talvolta linfocito-simili), con scarso citoplasma, cromatina nucleare finemente granulare e nucleoli assenti o incospicui. Le cellule tumorali sono generalmente aggregate in nidi che mostrano un'architettura di tipo ghiandolare o squamoso. Studi ultrastrutturali, inoltre, hanno mostrato la presenza in alcune di esse di granuli di tipo neurosecretorio a nucleo denso, simili a quelli delle cellule neuroendocrine argentaffini di Kulchitsky presenti nell'epitelio bronchiale fetale o neonatale, e che conferiscono una positività a marcatori neuroendocrini come la cromogranina e la sinaptofisina (**Figura 2a**) [1,2,4].

Il **CARCINOMA A CELLULE SQAMOSE DEL POLMONE (SCC)** costituisce circa il 30% dei casi di carcinoma del polmone e si manifesta in genere come una massa endobronchiale localizzata in posizione centrale. Il SCC è caratterizzato dalla presenza di cheratinizzazione, ben visibile per la presenza di elementi cellulari fusiformi intensamente eosinofili e totalmente o quasi totalmente privi di nuclei, e di spine che protrudono dalla membrana cellulare formando dei ponti intercellulari. La combinazione e l'intensa proliferazione degli elementi fusiformi in strati concentrici

porta alla formazione di zone concentriche con elevatissima cheratinizzazione che prendono il nome di **PERLE CORNEE** (**Figura 2b**) [1,2,5].

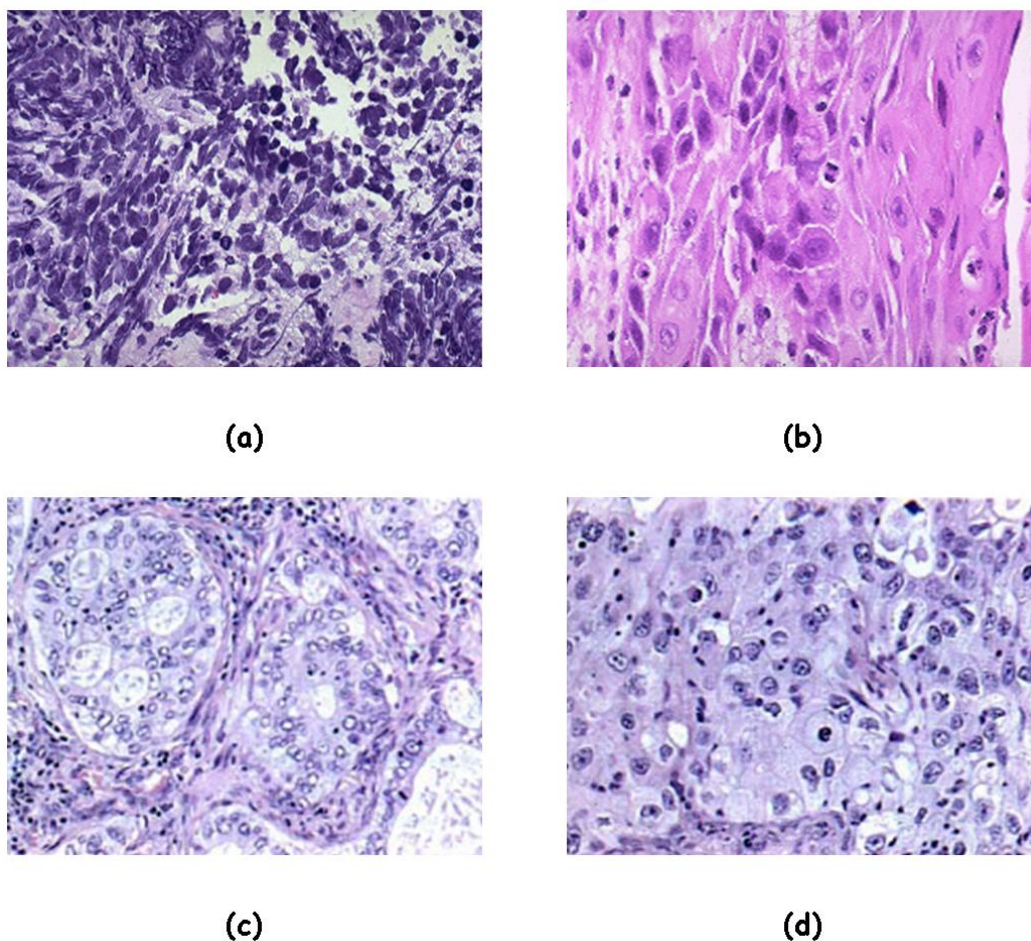


Figura 2. Classificazione istologica del carcinoma del polmone: **(a)** Carcinoma a piccole cellule del polmone, **(b)** Carcinoma a cellule squamose del polmone, **(c)** Adenocarcinoma del polmone e **(d)** Carcinoma a grandi cellule del polmone.

L'**ADENOCARCINOMA DEL POLMONE (ADC)** rappresenta circa il 40% dei casi di carcinoma del polmone e si origina dai bronchi di piccolo calibro come una massa periferica eterogenea che metastatizza precocemente. L'ADC presenta una differenziazione ghiandolare, caratterizzata dalla presenza di strutture acinari, papillari, bronchiolo-alveolari, solide o miste, e dalla produzione di **MUCINA** che spesso forma un vacuolo prominente che comprime il nucleo ai margini delle cellule dando origine alle cosiddette **CELLULE CON CASTONE** (*signet-ring cell*). Le cellule tumorali nell'ADC si radunano a formare una struttura ghiandolare, che man mano che il tumore diventa più

indifferenziato assume un aspetto da acinare a papillare a solido, con elementi cellulari atipici e pleomorfi di difficile caratterizzazione e inquadramento (**Figura 2c**) [1,2,5].

Il **CARCINOMA A GRANDI CELLULE DEL POLMONE (LCC)**, infine, rappresenta circa il 10% dei carcinomi del polmone e si sviluppa soprattutto nelle zone polmonari periferiche come grandi masse associate con precoci metastasi e collasso lobare. Il LCC è una neoplasia altamente indifferenziata che manca sia delle caratteristiche citologiche ed architetturali del SCLC che della differenziazione squamosa del SCC o ghiandolare dell'ADC. Il LCC è caratterizzato dalla presenza di elementi cellulari di dimensioni notevoli e pleomorfi, da un citoplasma scarso e da nuclei irregolari, di dimensioni variabili e vescicolosi, in cui è possibile apprezzare nucleoli prominenti ed intensamente cromofili. Questi tumori, inoltre, possono mostrare un certo grado di differenziazione neuroendocrina, confermata dall'aspetto di crescita organoide e dalla secrezione di mucine (**Figura 2d**) [1,2,5].

La distinzione dei carcinomi polmonari in SCLC e NSCLC è di fondamentale importanza per le successive decisioni cliniche, in quanto l'approccio terapeutico seguito per i due tipi di neoplasia cambia radicalmente a seconda che ci si trovi di fronte all'una o l'altra forma [6]. Tuttavia, se fino a qualche anno fa la distinzione tra SCLC e NSCLC era sufficiente all'oncologo per individuare lo schema di trattamento più appropriato, oggi non lo è più, e sempre più il patologo si trova di fronte alla necessità di dover distinguere nell'ambito dei NSCLC i SCC dagli ADC, riducendo al minimo i casi diagnosticati come NSCLC non altrimenti specificato (NSCLC-NOS) in pazienti in stadio avanzato. Questa esigenza è dettata dalla possibilità di eleggere al trattamento con i farmaci a bersaglio molecolare i pazienti con ADC, ma non con SCC, per i quali questi farmaci si rivelano inefficaci o presentano profili di tossicità molto elevata [6,7].

Queste considerazioni hanno rappresentato il razionale per un cambiamento radicale nell'approccio alla classificazione del carcinoma del polmone. Le nuove linee guida per la classificazione dei carcinomi del polmone elaborate da Travis e collaboratori [8], infatti, prevedono un approccio algoritmico che enfatizza l'utilizzo e l'integrazione di diverse metodiche, quali l'immunoistochimica, l'immunocitochimica e la biologia molecolare, per ottenere una diagnosi quanto più accurata possibile.

Le nuove linee guida, inoltre, sottolineano un uso strategico del materiale, soprattutto nel caso di piccole biopsie, preservando quanto più materiale possibile per potenziali

studi di biologia molecolare, data l'importanza fondamentale che queste determinazioni hanno ai fini del trattamento clinico del paziente (**Figura 3**) [8].

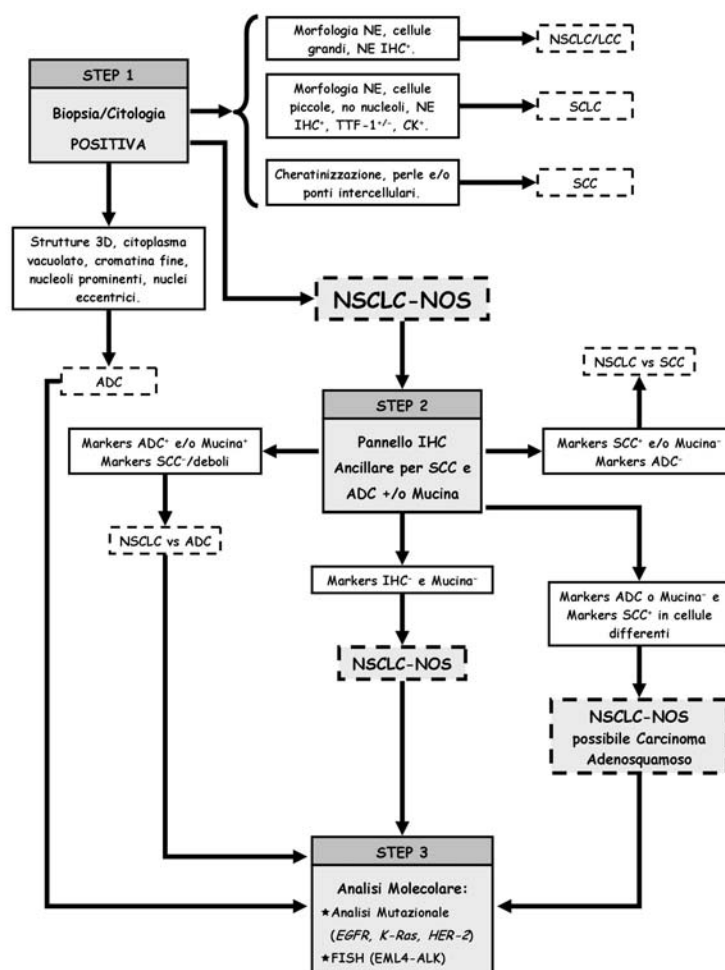


Figura 3. Nuove linee guida per la classificazione dei carcinomi del polmone.

1.3 Strategie terapeutiche nei carcinomi del polmone

La scelta tra le diverse strategie terapeutiche attualmente disponibili per il trattamento del carcinoma del polmone, che includono la chirurgia, la chemioterapia, la radioterapia ed il trattamento con farmaci a bersaglio molecolare, dipende dal tipo istologico, dall'estensione della malattia e dalle condizioni di salute del paziente, valutabili secondo la scala dell'*Eastern Cooperative Oncology Group* [9-12].

Il SCLC è caratterizzato da un'elevata malignità clinica e dalla comparsa di precoci metastasi regionali e/o a distanza (linfonodi superficiali, scheletro, midollo osseo,

fegato, sistema nervoso). Questo tipo di neoplasia è più diffuso nei pazienti di sesso maschile e la sua insorgenza è fortemente influenzata dal fumo di sigaretta, tanto che solo l'1% dei casi di SCLC si manifesta nei non fumatori [1,2,4].

Le manifestazioni cliniche del SCLC sono tipiche dei tumori centrali e dipendono dal calibro del bronco interessato e dalla grandezza raggiunta dalla massa tumorale; i sintomi più frequenti includono tosse stizzosa, provocata sia dall'irritazione dell'epitelio bronchiale dovuta alla massa tumorale vegetante che dall'irritazione ostruttiva ed infiammatoria, febbre, dispnea e sindromi paraneoplastiche, quali la **SINDROME DA INAPPROPRIATA SECREZIONE DI ADH**, la **SINDROME DI CUSHING** e la **SINDROME DI LAMBERT-EATON** [4,9].

Nel SCLC, la presenza di metastasi diffuse alla diagnosi preclude generalmente qualsiasi tipo di trattamento chirurgico. Nonostante siano normalmente inoperabili, queste neoplasie presentano un'elevata sensibilità ai trattamenti radioterapici e chemioterapici, soprattutto con combinazioni farmacologiche che utilizzano derivati del platino, quali il *cis*-platino ed il carboplatino, in combinazione con la gemcitabina, il paclitaxel, la vinorelbina, il topotecano o l'irinotecano. Tuttavia, la malignità intrinseca del tumore e la rapida insorgenza di poli-chemioresistenza, rendono la chemioterapia e la radioterapia un dispositivo non ancora in grado di portare alla risoluzione completa della malattia, per cui la prognosi dei SCLC resta comunque molto sfavorevole con una sopravvivenza media di circa un anno dalla diagnosi [1,3,4,9].

I NSCLC rappresentano delle neoplasie insidiose dal punto di vista clinico, che si manifestano tardivamente con atelectasia, tosse, dolore toracico, dispnea e presenza di strie ematiche nell'escreato. L'incidenza dei due principali istotipi di NSCLC, ADC e SCC, è diversa nei due sessi e in relazione con l'abitudine al fumo, con l'ADC più diffuso nei non fumatori e nei pazienti di sesso femminile ed il SCC più frequente nei fumatori e nei pazienti di sesso maschile [1,2]. In genere, gli ADC e i SCC tendono a rimanere localizzati più a lungo ed hanno una prognosi lievemente migliore rispetto ai LCC, che di solito vengono diagnosticati in una fase molto avanzata ed hanno tassi di sopravvivenza globale a 5 anni dalla diagnosi pari soltanto al 3%, rispetto al 10% dei SCC e degli ADC [1-3].

Per quanto riguarda il trattamento dei NSCLC, la strategia di trattamento differisce a seconda dello stadio della malattia. In generale, per i pazienti con una malattia in fase

precoce (stadio I, II e IIIA) il trattamento di elezione è rappresentato dalla chirurgia (lobectomia con linfadenectomia), eventualmente seguita da un trattamento chemioterapico e/o radioterapico a scopo precauzionale. Nei pazienti con malattia allo stadio IIIB e IV, in cui invece la chirurgia viene esclusa, la terapia di scelta è rappresentata dalla chemioterapia e/o radioterapia ad alte dosi nel primo caso e da una terapia palliativa sistemica nel secondo caso. Per molti anni, infatti, la terapia standard per il NSCLC in fase avanzata è stata la sola terapia di supporto, costituita da una qualsiasi associazione di derivati del platino (*cis*-platino o carboplatino) con un chemioterapico di ultima generazione come la gemcitabina, la vinorelbina, il paclitaxel o il docetaxel [6,7,9].

Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, gli enormi progressi fatti nella comprensione dei processi biologici alla base dello sviluppo dei NSCLC ha portato allo sviluppo di farmaci biologici a bersaglio molecolare che consentono di ottenere in pazienti che presentano determinate alterazioni genetiche dei risultati in termini di sopravvivenza globale del tutto impensabili appena pochi anni fa [6,7,9]. Attualmente, per il trattamento dei NSCLC in stadio avanzato e metastatici sono stati approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*) due **INIBITORI DELL'ATTIVITÀ TIROSIN-CHINASICA (TKI)**, che hanno come bersaglio molecolare il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide **EGFR**, il Gefitinib® (Iressa) e l'Erlotinib® (Tarceva), ed un **FARMACO ANTI-ANGIOGENETICO**, il Bevacizumab® (Avastin), che è un anticorpo monoclonale umanizzato che inibisce la neoangiogenesi legandosi al fattore di crescita dell'endotelio vascolare **VEGF-A** [10-12].

1.4 Caratterizzazione biomolecolare dei carcinomi del polmone

Negli ultimi anni, la caratterizzazione biomolecolare dei carcinomi polmonari è quindi diventata di importanza fondamentale per l'inquadramento clinico dei pazienti affetti da questa patologia. Sulla base delle cosiddette **DRIVER MUTATIONS**, che interessano geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, è possibile classificare ulteriormente i carcinomi del polmone in *subset* molecolari clinicamente rilevanti [13-15].

Nei carcinomi del polmone le *driver mutations* coinvolgono principalmente geni quali *EGFR*, *K-Ras*, *HER-2*, *ALK* e *c-Met*, che svolgono un ruolo cruciale sia

nell'iniziazione che nella progressione dei carcinomi polmonari, ed una volta identificate offrono la possibilità di colpire selettivamente le cellule tumorali con dei farmaci a bersaglio molecolare [10-15].

1.4.1 Mutazioni del gene *EGFR*

Il gene *EGFR* è localizzato sul cromosoma 7p11.2 e codifica per un recettore tirosin-chinasico appartenente alla superfamiglia ErbB, che presenta una struttura caratterizzata da un dominio extracellulare che lega il ligando, un breve tratto idrofobico transmembrana e un dominio intracitoplasmatico con attività di tirosina chinasi. La dimerizzazione di EGFR conseguente al legame del ligando specifico in condizioni fisiologiche o a mutazioni e/o amplificazione del gene in condizioni patologiche, determina l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina all'interno del dominio intracitoplasmatico e l'attivazione dei *pathway* di segnalazione cellulare delle MAPK chinasi e della PI3K/Akt chinasi, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione cellulare, nella sopravvivenza, nell'apoptosi, nell'invasione e nei processi di diffusione metastatica (**Figura 4**) [16-18].

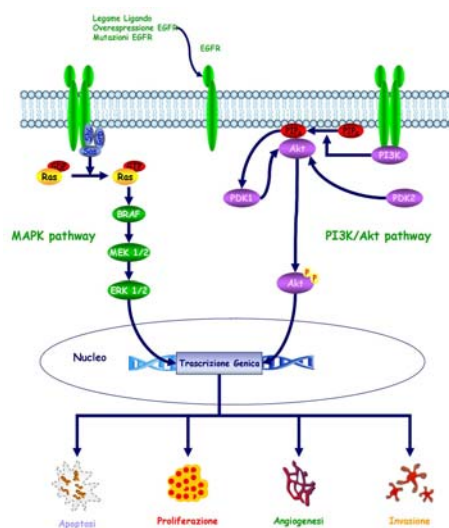


Figura 4. *Pathway* cellulari regolati da EGFR.

Le strategie terapeutiche a bersaglio molecolare che prevedono l'utilizzo dei TKI si basano sulla capacità di questi farmaci di inibire selettivamente e reversibilmente la fosforilazione del dominio tirosin-chinasico di EGFR senza indurre l'internalizzazione

del recettore o la sua degradazione ed esercitano la loro attività antitumorale attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare, l'induzione dell'apoptosi e l'inibizione dell'angiogenesi. I benefici clinici osservati con i TKIs sono tuttavia limitati ai pazienti che presentano mutazioni somatiche o l'amplificazione del gene *EGFR*. Per questo motivo, lo scopo principale dei test genetici di *screening* nei NSCLC è attualmente quello di stratificare i pazienti in base allo *status* mutazionale del gene *EGFR*, in modo da selezionare i pazienti che potranno beneficiare di questo tipo di approccio terapeutico [13,14,19].

Le mutazioni del gene *EGFR* si riscontrano con una frequenza del 15-20% nei NSCLC e sono più diffuse nei pazienti Asiatici, nelle donne, nei non fumatori e negli ADC [14,15,20].

La maggior parte delle mutazioni del gene *EGFR* sono localizzate a livello degli esoni che vanno dal 18 al 21, che codificano per il dominio tirosin-chinasico del recettore ed includono delezioni, inserzioni e mutazioni puntiformi missenso che interessano il sito di legame all'ATP (**Figura 5**) [19-22].

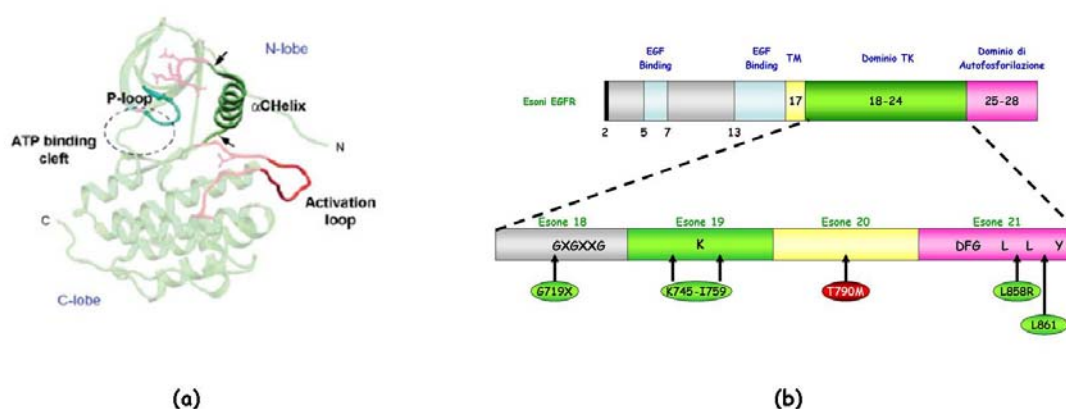


Figura 5. (a) Struttura tridimensionale e **(b)** localizzazione delle mutazioni del gene *EGFR*.

Nei NSCLC, le mutazioni più frequenti del gene *EGFR* sono rappresentate da delezioni *in frame* degli amminoacidi dal 746 al 750 dell'esone 19 (~44% delle mutazioni), che eliminano il **MOTIVO ELREA**, altamente conservato, rendendo il recettore attivo indipendentemente dal legame del ligando. Le mutazioni puntiformi missenso del gene *EGFR* sono invece localizzate su tutti e quattro gli esoni codificanti per il dominio tirosin-chinasico e quelle più frequenti sono rappresentate dalle

sostituzioni p.L858R nell'esone 21 (~41% delle mutazioni) e p.G719X (dove X indica un qualsiasi amminoacido tra Alanina, Cisteina o Serina) nell'esone 18 (~4% delle mutazioni). Infine, le duplicazioni e le inserzioni *in frame* riscontrate nell'esone 20 rappresentano circa il 5% del totale delle mutazioni a carico del gene EGFR e determinano cambiamenti conformazionali simili a quelli provocati dalle delezioni dell'esone 19 e dalle mutazioni puntiformi degli esoni 18 e 21, che causando uno *shift* dell'asse dell'elica provocano un restringimento del sito di legame per l'ATP che porta all'attivazione costituzionale di EGFR [21,22].

Tutte le mutazioni sopra descritte sono strettamente correlate ad una maggiore sensibilità al trattamento con i TKI. Tuttavia, molti studi hanno dimostrato che in alcuni pazienti, inizialmente responsivi al trattamento con Gefitinib® ed Erlotinib®, spesso si osserva una ricomparsa della malattia che risulta resistente all'ulteriore trattamento con TKI. L'analisi mutazionale di questi pazienti ha dimostrato che la resistenza al trattamento con TKI è associata all'acquisizione di mutazioni secondarie a livello dell'esone 20 del gene *EGFR*, che includono la mutazione p.T790M e in minor misura le mutazioni p.D761Y e p.L747S. Studi di cristallografia hanno dimostrato che le sostituzioni a livello di questi residui amminoacidici, i quali sono localizzati all'interno del sito di legame per l'ATP, ostacolano stericamente il legame dei TKI rendendo la neoplasia non più responsiva al trattamento con questi farmaci [23,24].

1.4.2 Mutazioni del gene *K-Ras*

Il proto-oncogene *K-Ras* è localizzato sul cromosoma 12p12.1 e codifica per una proteina G monomerica con attività GTPasica intrinseca che agisce a valle di EGFR ed è dotata di due regioni, SWITCH-1 e SWITCH-2, che cambiano la loro conformazione a seconda che siano legate al GDP o al GTP (**Figura 6**) [25].

Le mutazioni a carico del gene *K-Ras* determinano una perdita dell'attività GTPasica di K-Ras, che risulta in un'attivazione costitutiva delle vie di trasduzione del segnale cellulare delle MAPK chinasi e delle PI3K/Akt chinasi con un aumento della proliferazione e della crescita cellulare e un'inibizione dell'apoptosi [25,26].

Tutte le mutazioni del gene *K-Ras* sono mutazioni somatiche puntiformi localizzate a livello di tre *hot-spot* mutazionali, che comprendono i codoni 12 e 13 nell'esone 2 (~97% delle mutazioni), il codone 61 nell'esone 3 e il codone 146 nell'esone 4, che

codificano per amminoacidi posizionati in prossimità del sito di legame per il GTP. Le mutazioni a livello di questi residui amminoacidici impediscono l'interazione di K-Ras con le proteine GAP responsabili dell'idrolisi del GTP in GDP, mantenendo in tal modo K-Ras costitutivamente attivo [25,26].

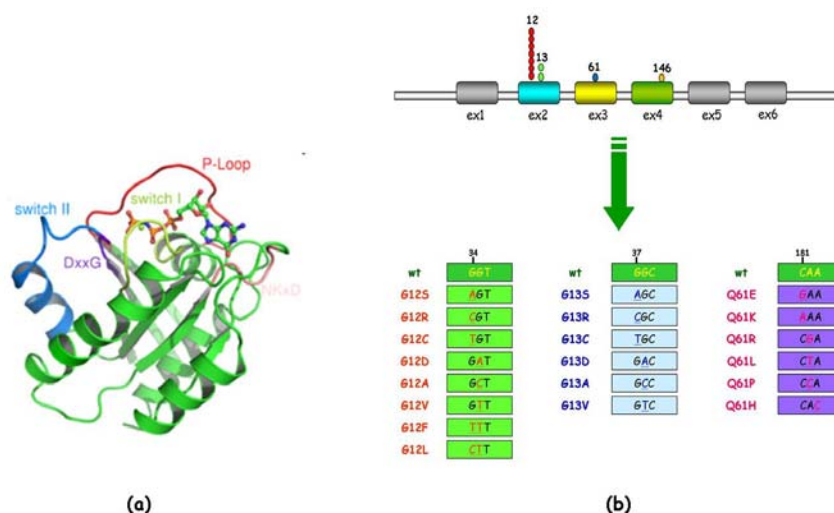


Figura 6. (a) Struttura tridimensionale e (b) localizzazione delle mutazioni del gene *K-Ras*.

Le mutazioni del gene *K-Ras* insorgono precocemente nel corso dell'oncogenesi polmonare essendo presenti anche in lesioni pre-neoplastiche, quali l'iperplasia alveolare atipica, e sono state descritte nel 15-30% dei casi di NSCLC. Come le mutazioni del gene *EGFR*, le mutazioni del gene *K-Ras* sono riscontrate più frequentemente negli ADC rispetto agli altri istotipi di NSCLC, ma a differenza di esse sono più diffuse nei pazienti Caucasici, nei maschi e nei pazienti fumatori o con un passato da fumatore; inoltre, le transizioni G>A sono molto più comuni nei non fumatori, mentre le transversioni G>T e G>C sono molto più frequenti nei fumatori o negli ex-fumatori [14,15,20].

Dal momento che K-Ras è un effettore a valle di EGFR, le mutazioni attivanti a carico di questo gene conferiscono resistenza al trattamento con i TKI, in quanto rendono il tumore indipendente dall'attivazione di EGFR e rappresentano un marcatore predittivo negativo altamente specifico [27].

1.4.3 Mutazioni del gene *HER-2*

Il gene *HER-2* è localizzato sul cromosoma 17q12 e codifica per una glicoproteina transmembrana di 185 kDa con attività tirosin-chinasica appartenente alla superfamiglia ErbB (**Figura 7**) [28,29].

HER-2 è overespresso in circa il 20% dei casi di NSCLC, ma l'amplificazione del gene si osserva solo nel 2% dei casi indicando la presenza di altri meccanismi molecolari che portano all'overespressione del recettore, quali l'iper-espressione del gene o la stabilizzazione dell'mRNA [28,29].

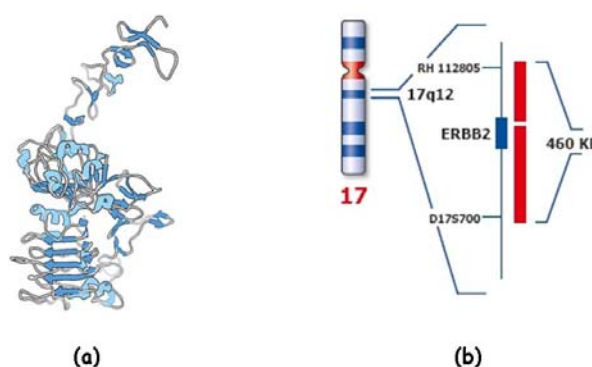


Figura 7. (a) Struttura tridimensionale e (b) localizzazione cromosomica del gene *HER-2*.

Le mutazioni del gene *HER-2* si osservano in circa il 3% dei casi di carcinoma del polmone, sono mutualmente esclusive con le mutazioni dei geni *EGFR* e *K-Ras* e si riscontrano più frequentemente nei non fumatori, nelle donne, nei pazienti di etnia asiatica e nell'ADC rispetto ad altri istotipi di carcinoma del polmone. La mutazione più frequente del gene *HER-2* è l'inserzione *in frame* degli amminoacidi YVMA tra i codoni 775 e 776 dell'esone 20 del gene. Dal punto di vista biologico questa mutazione determina l'attivazione costituzionale del recettore e le cellule che presentano tale mutazione risultano essere sensibili al trattamento con il Lapatinib[®], un TKI che ha come bersaglio sia *HER-2* che *EGFR* [29].

1.4.4 Riarrangiamenti del gene *ALK*

Il gene *ALK* è localizzato sul cromosoma 2p23 e codifica per un recettore tirosin-chinasico di 220 kDa il cui ligando ad oggi non è stato ancora identificato.

Recentemente, numerosi studi hanno dimostrato nei carcinomi polmonari così come in altre neoplasie l'attivazione della via di trasduzione del segnale controllata da ALK attraverso la creazione di una singolare fusione della porzione intracellulare di ALK, che detiene l'attività tirosin-chinasica, con la porzione N-terminale della proteina codificata dal gene *EML4* e più raramente del gene *KIF5B*. Il prodotto di fusione ALK-*EML4* deriva da un'inversione all'interno del braccio corto del cromosoma 2 e fu descritto per la prima volta da Soda e collaboratori nel 2007 (**Figura 8**) [30].

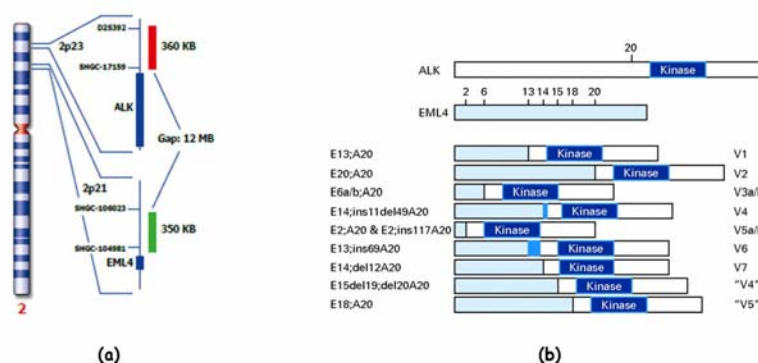


Figura 8. (a) Localizzazione dei geni *ALK* ed *EML4* e (b) differenti varianti del riarrangiamento *ALK/EML4*.

Ad oggi, sono state descritte 9 diverse varianti del riarrangiamento *ALK/EML4*, che si differenziano in base al punto di rottura del gene *EML4*, che può essere troncato a livello degli esoni 2, 6, 13, 14, 15, 18 o 20, mentre il punto di rottura del gene *ALK* è localizzato nell'esone 20 per tutte le varianti (**Figura 8**) [30,31].

La fusione *ALK-EML4* determina l'oligomerizzazione delle proteine tronche con conseguente attivazione costitutiva della chinasi ed è presente in una percentuale che varia dal 3 al 7% dei pazienti con NSCLC. La frequenza del riarrangiamento è più alta nei soggetti giovani, nei pazienti di etnia asiatica, nei pazienti con adenocarcinoma e nei non fumatori o nei deboli fumatori (≤ 15 pacchetti di sigarette/anno). Generalmente, la fusione *ALK-EML4* è presente nei pazienti i cui tumori non presentano mutazioni a carico dei geni *EGFR* e *K-Ras* [30,31].

La presenza del riarrangiamento *ALK-EML4* rende il tumore polmonare sensibile al trattamento con Crizotinib[®], un piccolo TKI che inibisce contemporaneamente sia *ALK* che *c-Met* e che ha dimostrato una buona tollerabilità e ottimi risultati in termini di

risposta oggettiva e controllo della malattia in pazienti che presentavano tale alterazione genetica [31].

1.4.5 Mutazioni del gene *c-Met*

Il proto-oncogene *c-Met* è localizzato sul cromosoma 7q31.2 e codifica per il recettore tirosin-chinasico per il fattore di crescita degli epatociti HGFR che viene trascritto come un precursore di 150 kDa, il quale viene successivamente glicosilato e scisso portando alla formazione di una Catena α extracellulare di 50 kDa e una Catena β transmembrana di 140 kDa tenute insieme da ponti disolfuro (**Figura 9**) [33].

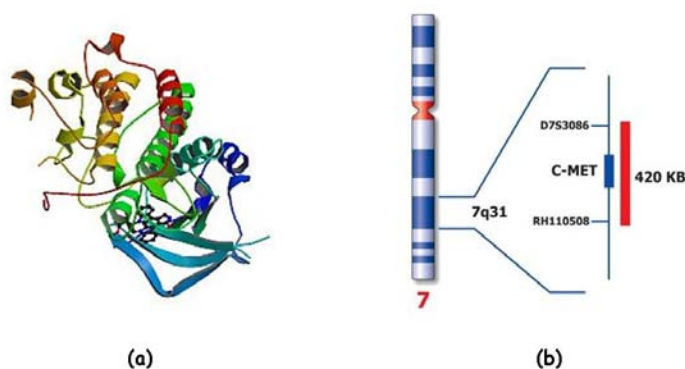


Figura 9. (a) Struttura tridimensionale e (b) localizzazione cromosomica di *c-Met*.

A differenza di altre neoplasie come il carcinoma renale o gastrico, nei NSCLC le mutazioni nel dominio chinasi del gene *c-Met* sono rare e includono principalmente mutazioni missenso, quali le sostituzioni p.R988C, p.Y1021N e p.G1260C [33]. Al contrario, l'amplificazione del gene *c-Met* è stata osservata in circa il 4% dei carcinomi del polmone ed è stata correlata ad una scarsa prognosi sia nei SCC che negli ADC, nei quali l'amplificazione genica è indipendente dalle mutazioni del gene *K-Ras* e dall'amplificazione del gene *EGFR* [33-35].

L'amplificazione del gene *c-Met* è stata associata all'insorgenza di resistenza secondaria al trattamento con i TKI attraverso un meccanismo che prende il nome di **SWITCH DELLE CHINASI** in circa il 20% dei pazienti con resistenza acquisita. Attualmente sono in corso diversi *trials* clinici che stanno vagliando l'efficacia di inibitori di c-Met e di un anticorpo monoclonale completamente umanizzato che si lega e neutralizza HGF impedendone così il legame a c-Met [33-35].

2. I microRNA

I microRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento di una lunghezza compresa tra i 17 ed i 22 nucleotidi che risultano essere altamente conservati nel corso della filogenesi. I microRNA regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, legandosi in modo specifico a sequenze complementari presenti nei trascritti degli RNA messaggeri (mRNA) che ne costituiscono il bersaglio [36-38].

Le prime evidenze dell'esistenza dei microRNA sono piuttosto recenti e risalgono al 1993, quando un piccolo RNA di 22 nucleotidi codificato dal *locus lin-4* fu associato al tempo di sviluppo del nematode *Caenorhabditis elegans* attraverso la modulazione della proteina lin-14.1 [39]; tuttavia, è solo negli ultimi anni che i microRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando il loro ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica.

Ad oggi sono stati identificati sia mediante un approccio sperimentale che mediante analisi computazionali più di 1500 diversi microRNA umani (miRbase, <http://www.mirbase.org>), ciascuno dei quali è in grado di regolare l'espressione di centinaia di geni *target*, ed è stato stimato che la maggior parte dei 25,000 geni umani sia regolato da almeno un microRNA [40].

Numerosi studi hanno dimostrato che i microRNA presentano profili di espressione specifici per stadio di sviluppo, tessuto e patologia, ed intervengono nella regolazione di processi fisiologici di importanza fondamentale, quali ad esempio la proliferazione cellulare, il differenziamento, l'apoptosi, il metabolismo, l'angiogenesi e la risposta a differenti segnali extracellulari e di stress (**Figura 10**) [41-44].

Expression pattern	microRNA
<i>Tissue-specific expression patterns of mammalian microRNAs</i>	
ES-cell specific	miR-296
Expressed in ES cells, but upregulated on differentiation	miR-21 and miR-22
Expressed in both ES cells and various adult tissues	miR-15a, miR-16, miR-19b, miR-92, miR-93, miR-96, miR-130 and miR-130b
Enriched during mouse brain development	miR-128, miR-19b, miR-9, miR-125b, miR-131, miR-178, miR-124a, miR-266 and miR-103
Enriched in adult brain	miR-9*, miR-125a, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-137, miR-139, miR-7, miR-9, miR-124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-149, miR-183, miR-190 and miR-219
Enriched in lung	miR-18, miR-19a, miR-24, miR-32, miR-130, miR-213, miR-20, miR-141, miR-193 and miR-200b
Enriched in spleen	miR-99a, miR-127, miR-142-a, miR-142-s, miR-151, miR-189 and miR-212
Haematopoietic tissues	miR-181, miR-223 and miR-142
Enriched in liver	miR-122a, miR-152, miR-194, miR-199 and miR-215
Enriched in heart	miR-1b, miR-1d, miR-133, miR-206, miR-208 and miR-143
Enriched in kidney	miR-30b, miR-30c, miR-18, miR-20, miR-24, miR-32, miR-141, miR-193 and miR-200b
Ubiquitously expressed	miR-16, miR-26a, miR-27a, miR-143a, miR-21, let-7a, miR-7b, miR-30b and miR-30c

Figura 10. *Patterns* di espressione dei microRNA nei diversi tessuti umani.

I geni codificanti per i microRNA sono presenti su tutti i cromosomi umani ad eccezione del cromosoma Y, e sono localizzati per circa il 70% a livello di regioni intergeniche, mentre per il restante 30% a livello di regioni introniche o di regioni esoniche di specifici geni, che sono detti **GENI OSPITI** (**Figura 11**) [45-47].

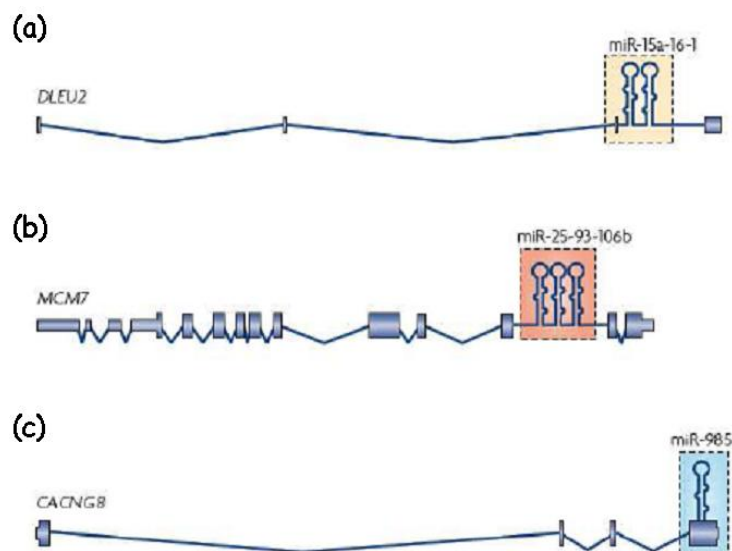


Figura 11. Localizzazione genomica dei geni dei microRNA a livello (a) delle regioni intergeniche, (b) delle unità trascrizionali introniche e (c) delle unità trascrizionali esoniche.

Nei Mammiferi, circa il 50% dei geni codificanti per differenti microRNA sono localizzati in *loci* adiacenti e sono organizzati in veri e propri *clusters*. I microRNA dei *clusters* sono spesso funzionalmente correlati e possono essere trascritti individualmente a partire da promotori separati oppure simultaneamente generando un trascritto primario policistronico [45-47].

Inoltre, la maggior parte dei geni che codificano per i microRNA hanno isoforme multiple, dette **PARALOGHE**, probabilmente dovute ad eventi di duplicazione genica. Dal momento che i microRNA paraloghi conservano una sequenza identica a livello delle posizioni nucleotidiche 2-7 della porzione 5', che costituisce la sequenza *seed* responsabile del riconoscimento dell'mRNA bersaglio, ma presentano *patterns* di espressione differenti, si pensa che i membri paraloghi di una stessa famiglia possano svolgere ruoli distinti *in vivo* [45].

2.1 Biogenesi dei microRNA

La maggior parte dei geni per i microRNA viene trascritta dalla RNA polimerasi II [48], sebbene un piccolo gruppo di essi, associati alle sequenze ripetute Alu, sia trascritto dalla RNA polimerasi III [49]. Un ampio numero di fattori di trascrizione associati alle due RNA polimerasi controllano la trascrizione genica dei microRNA, consentendo una fine regolazione temporale e spaziale della loro espressione [50,51].

I microRNA vengono trascritti dalla RNA polimerasi II o III sotto forma di lunghi trascritti primari di diverse centinaia di nucleotidi, detti **PRI-MICRORNA**, caratterizzati dalla presenza di complesse strutture a forcina a doppio filamento, che si formano grazie alla presenza di sequenze complementari imperfette (**Figura 12**).

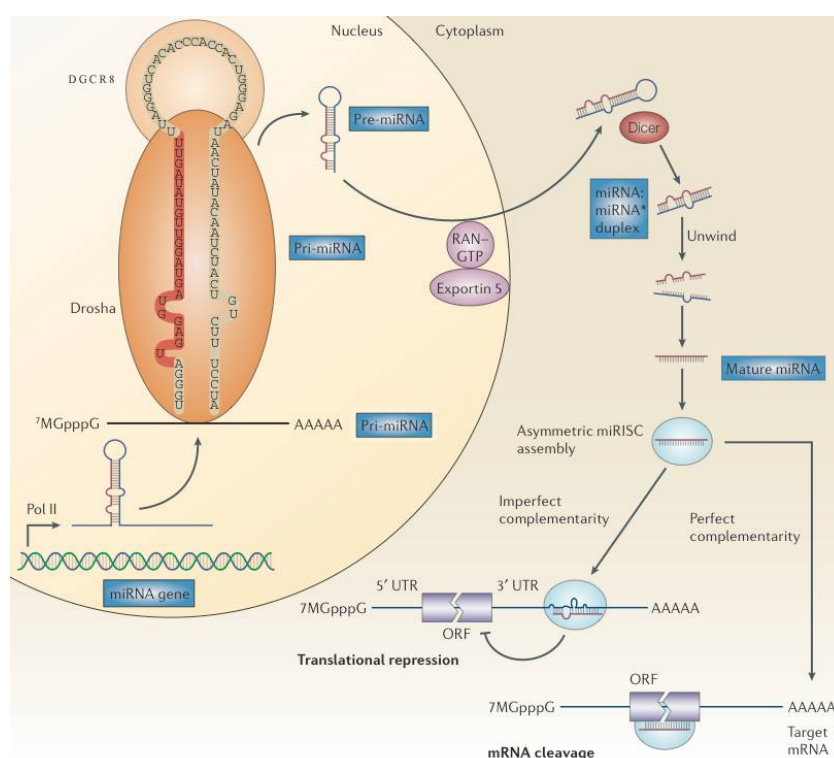


Figura 12. Biogenesi dei microRNA.

Nel nucleo, i pri-microRNA sono processati dal **COMPLESSO MICRO-PROCESSORE**, formato da **Drosha** e da **DGCR8** a formare un microRNA precursore, detto **PRE-MICRORNA**, della lunghezza di 70-100 nucleotidi contenente una struttura a forcina imperfetta di 33 nucleotidi ed un'ansa terminale (**Figura 12**). Drosha è una proteina di 160 kDa altamente conservata durante l'evoluzione che contiene un dominio che si lega

alle molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA), presente anche in DGCR8, ed un dominio con attività di RNAsi di tipo III che agisce generando delle estremità 3' sporgenti di due nucleotidi. Sebbene il meccanismo mediante il quale Drosha discrimini i differenti precursori dei microRNA sia ancora sconosciuto, molteplici evidenze descrivono che l'efficienza di processamento dipende dalla grandezza dell'ansa terminale, dalla struttura della forcina e dalle sequenze fiancheggianti il sito di taglio riconosciuto. Questa ipotesi è supportata anche da evidenze che mostrano che mutazioni in queste regioni inibiscono in maniera significativa l'attività di Drosha [50-53].

Successivamente, le molecole di pre-microRNA vengono esportate dal nucleo al citoplasma attraverso un meccanismo mediato dall'**Esportina 5**, un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente [54]. Una volta all'interno del citoplasma, i pre-microRNA vanno incontro ad un ulteriore *step* di maturazione mediato da un enzima di 200 kDa altamente conservato tra le diverse specie animali chiamato **Dicer**, in cui è possibili individuare differenti domini: un dominio di legame al dsRNA, due domini catalitici con attività di RNAsi di tipo III, un dominio PAZ che si lega alle estremità 3' dei piccoli RNA, un dominio con attività ATPasica, e un dominio con attività elicasica. Dicer rimuove l'ansa terminale e produce una piccola molecola di RNA duplex, **MICRORNA/MICRORNA***, con appaiamenti imperfetti di dimensioni variabili tra i 21 ed i 25 nucleotidi, formata da un filamento guida che costituirà il microRNA maturo (microRNA) e dal suo complementare detto filamento passeggero (microRNA*) (**Figura 12**) [50-54].

Il duplex microRNA/microRNA* viene quindi incorporato nel complesso multiproteico **RISC** (*RNA-Induced Silencing Complex*) dopo essere stato legato dalla proteina **Argonauta**, che presenta due domini altamente conservati, un dominio PAZ ed un dominio Piwi che per la sua omologia con la RNAsi H sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio dell'mRNA bersaglio (**Figura 12**) [50,51,55].

La determinazione di quale filamento sarà il filamento guida e quale il filamento passeggero dipende dalla stabilità termodinamica delle estremità 5' del duplex di RNA. Infatti, sebbene i microRNA maturi possano essere localizzati indistintamente in uno o l'altro filamento dell'RNA duplex, solo il filamento dotato di minore stabilità termodinamica alla sua estremità 5' viene riconosciuto dal complesso RISC. All'interno di esso, il filamento guida rimane legato ad Argonauta ed attiva il complesso RISC che

diventa così in grado di riconoscere l'mRNA bersaglio di quello specifico microRNA, mentre il filamento passeggero (microRNA*) viene degradato da un enzima con attività elicastica presente nel complesso RISC. Nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può andare a costituire con la stessa probabilità il microRNA maturo dotato di attività biologica [55-57].

2.2 Regolazione post-trascrizionale mediata dai microRNA

Una volta all'interno del complesso proteico RISC, il microRNA maturo si appaia tramite la sua sequenza *seed* a specifiche sequenze complementari localizzate a livello della regione 3'UTR degli mRNA bersaglio e spesso presenti in copie multiple bersaglio, ed esplica la propria funzione di regolazione dell'espressione genica [50-53,58].

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica ad opera dei microRNA può avvenire mediante due meccanismi principali, che determinano il silenziamento dell'espressione genica: la **REPRESSIONE DELLA TRADUZIONE** e la **DEGRADAZIONE DELL'mRNA BERSAGLIO** [50-53,58].

La determinazione di quale dei due meccanismi venga attuato dipende dal grado di complementarietà esistente tra la regione *seed* del microRNA e la sequenza del 3'UTR dell'mRNA bersaglio. Infatti, se la complementarietà tra le due sequenze è perfetta, il legame del microRNA al 3'UTR dell'mRNA ne determina la de-adenilazione con conseguente degradazione del messaggero all'interno del complesso RISC a causa di un'aumentata instabilità dell'mRNA stesso (**Figura 13**) [50-53,58].

Tuttavia, nella maggior parte dei casi l'appaiamento della regione *seed* del microRNA con la sequenza del 3'UTR dell'mRNA bersaglio avviene in maniera imperfetta e ciò determina l'inibizione della traduzione del messaggero *target*. La repressione della traduzione può avvenire con diversi meccanismi, che includono la prevenzione dell'associazione dei ribosomi con l'mRNA bersaglio, il blocco dell'inizio della traduzione dovuto alla competizione del complesso microRNA/RISC con il fattore eIF4E per il *cap* in 5', il distacco prematuro dei ribosomi, il blocco della fase di elongazione della traduzione, nonché la degradazione co-traduzionale della proteina appena sintetizzata (**Figura 13**) [50-53,58].

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che i microRNA possono determinare anche un aumento dell'espressione dei loro geni *target*, sia direttamente legandosi alle sequenze ARE dell'mRNA bersaglio [59], sia indirettamente attraverso il meccanismo di NMD (*Nonsense-Mediated RNA Decay*), che determina la degradazione dei trascritti che presentano dei codoni di stop in determinati contesti della sequenza nucleotidica [60].

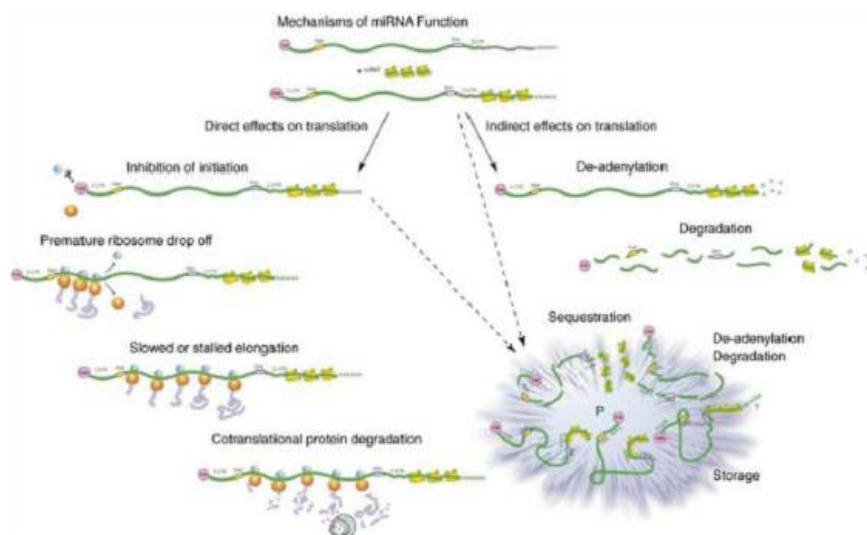


Figura 13. Meccanismo di repressione post-trascrizionale ad opera dei microRNA. L'interazione tra il microRNA e l'mRNA bersaglio può avere diversi effetti sulla traduzione, determinando la degradazione dell'mRNA o l'inibizione della traduzione.

2.3 Predizione bioinformatica dei *target* molecolari dei microRNA

L'identificazione dei geni regolati dai microRNA rappresenta un punto cruciale nella comprensione del ruolo funzionale dei microRNA stessi e delle complesse reti molecolari alla base della regolazione genica. La complessità nell'identificazione degli mRNA bersaglio dei microRNA è dovuta sia al fatto che essi hanno sequenze molto corte che all'imperfezione del loro appaiamento con il *target* molecolare. Pertanto, accanto all'analisi genetica, negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi algoritmi bioinformatici, quali ad esempio miRanda (<http://www.microrna.org/microrna>), TargetScan (<http://www.targetscan.org>), Pictar (<http://www.pictar.org>) e miRDB (<http://mirdb.org>), che permettono la predizione *in silico* degli ipotetici bersagli dei microRNA [61,62]. Questi algoritmi basano la predizione degli ipotetici *target* dei microRNA analizzati su diversi principi che includono:

- La complementarità imperfetta esistente tra il microRNA e il 3'UTR del *target* e il forte legame tra i nucleotidi della regione *seed* al 5' rispetto al 3'.
- La conservazione evolutiva tra le diverse specie delle sequenze bersaglio al 3' del *target*.
- La stabilità termodinamica del duplex microRNA-mRNA.
- La cooperatività tra i siti multipli di legame presenti in stretta prossimità.
- La molteplicità e cooperatività delle interazioni tra il microRNA ed il *target*.
- La perdita della struttura secondaria dell'mRNA bersaglio al sito di legame per il microRNA [61,62].

L'analisi *in silico*, che assegna un punteggio da 0 a 100, dove 0 indica l'assenza di qualsiasi complementarità e 100 la presenza di una complementarità perfetta, deve essere successivamente affiancata da un'analisi funzionale *in vitro*, al fine di dimostrare l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei microRNA e da studi con geni *reporter* al fine di dimostrare l'interazione diretta tra il microRNA ed il sito complementare presente nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio [61,62].

2.4 Regolazione dell'espressione dei microRNA

Dato il ruolo cruciale svolto nella regolazione dell'espressione genica, l'espressione dei microRNA è finemente regolata durante la loro biogenesi a vari livelli, che includono la loro trascrizione, il processamento, l'*editing*, la degradazione ed il *turnover* [63,64].

La **REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE** dei microRNA avviene come per la maggior parte dei geni di seconda classe a livello del promotore, dove sono presenti gli stessi elementi regolatori dei promotori per i geni codificanti proteine, quali ad esempio il TATA *box*, le isole CpG e gli elementi di iniziazione [63,64].

Molti fattori di trascrizione sono implicati nella regolazione dell'espressione tessuto-specifica o sviluppo-specifica dei microRNA, come ad esempio MYC, che stimola l'espressione del *cluster* oncogenico *miR-17-92* in cellule di linfoma determinando un'attivazione della proliferazione cellulare e un'inibizione dell'apoptosi e concorrendo alla determinazione del fenotipo neoplastico [65], o REST, che inibisce l'espressione di *miR-124* in cellule non neuronali tramite la de-acetilazione degli istoni ad opera

dell'istone deacetilasi HDAC e la metilazione del promotore ad opera della metilasi MeCP2 [66]. Inoltre, i microRNA possono a loro volta regolare l'espressione degli stessi fattori di trascrizione creando così dei circuiti di regolazione positiva o negativa, nei quali il preciso controllo della quantità del microRNA o del fattore di trascrizione determina l'effetto fisiologico finale [63,64].

La **REGOLAZIONE DEL PROCESSAMENTO** dei microRNA avviene al livello di Drosha, di Dicer e delle loro proteine accessorie. Ad esempio, è stato dimostrato che alcune elicasi contenenti il dominio DEAD, quali p68 e p72, e le proteine SMAD, trasduttori dei segnali della via di TGF β e di BMP, agiscono a livello di Drosha controllando la produzione dei pri-microRNA, le prime agendo da *scaffold* per il reclutamento dei cofattori di Drosha a livello del complesso micro-processore e le seconde promuovendo il legame di Drosha alle strutture a forcina dei microRNA [67]. I livelli di Dicer, invece, vengono controllati e stabilizzati da TRBP, una proteina contenente un elemento TAR che lega il dsRNA, e dalla proteina chinasi PATC, la cui espressione determina un aumento generalizzato dei livelli di tutti i pre-microRNA [68].

L'**EDITING** dei pri-microRNA e dei pre-microRNA è svolto dalle adenosine deaminasi ADAR, che catalizzano la conversione dell'adenosina in inosina nei dsRNA. La risultante inosina ha caratteristiche biochimiche simili alla guanosina e si appaia preferenzialmente con la citosina, alterando la struttura secondaria e quindi la stabilità dei microRNA. Alterazioni simili che determinano l'introduzione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) o di mutazioni puntiformi all'interno della sequenza dei pri-microRNA e dei pre-microRNA hanno effetti sulle loro strutture secondarie simili a quelli dell'*editing* e ne impediscono l'ulteriore processamento da parte delle RNAsi Drosha e Dicer [63,64,67]. Complementari all'*editing* della regione *seed* dei microRNA sono gli SNPs all'interno della regione 3'UTR dei geni *target*, che alterano la funzione dei microRNA introducendo o distruggendo dei siti di legame. Ad esempio, Chin e collaboratori [68] hanno descritto uno SNP all'interno del sito di legame per il microRNA *Let-7* nella regione 3'UTR del gene *K-Ras* che aumenta il rischio di sviluppare NSCLC riducendo la repressione *Let-7*-mediata di *K-Ras*, mentre uno SNP nel 3'UTR della di-idrofolato reduttasi (DHFR) descritto da Mishra e collaboratori [69] ne impedisce la repressione da parte di *miR-24*, determinando un'over-espressione della

DHFR con conseguente induzione di resistenza al trattamento chemioterapico con metotrexate.

Infine, la **REGOLAZIONE DELLA DEGRADAZIONE E DEL *TURNOVER*** dei microRNA maturi permette di controllarne i livelli all'interno della cellula e quindi il loro effetto biologico. È stato osservato che i microRNA sono in generale più stabili dei messaggeri di seconda classe avendo un'emivita che va da alcune ore a molti giorni. La degradazione e il *turnover* dei microRNA è regolata dall'attività di nucleasi che degradano i microRNA a singolo filamento, da modificazioni post-trascrizionali, quali ad esempio l'aggiunta di una coda di adenosina all'estremità 3' da parte della polimerasi citoplasmatica GLD-2, e da segnali extra-cellulari, quali ad esempio l'ipossia o il trattamento con interferone che regolano rispettivamente i livelli di *miR-199a* e *miR-122*. In generale, comunque il preciso controllo della degradazione dei microRNA svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi di risposta di tipo *switch on-off* durante lo sviluppo e nelle risposte ai segnali extracellulari e agli stress, in cui la traduzione del messaggero *target* viene bloccata e riattivata a seconda delle condizioni [63,64].

2.5 Ruolo dei microRNA nelle neoplasie umane

La prima dimostrazione che i microRNA potessero essere coinvolti nella patogenesi dei tumori umani deriva dagli studi di Calin e collaboratori [70], i quali nel tentativo di isolare i geni oncosoppressori localizzati nella regione cromosomica 13q14 responsabili di più del 50% dei casi di leucemia linfatica cronica, hanno identificato i due microRNA, *miR-15a* e *miR-16-1*, che hanno come bersaglio la proteina anti-apoptotica Bcl₂.

In seguito a questa prima osservazione sperimentale, il numero di studi che negli ultimi anni hanno dimostrato l'esistenza di una stretta relazione tra il profilo di espressione dei microRNA e lo sviluppo di neoplasie di vario tipo sono aumentate in maniera vertiginosa. Questi studi hanno messo in evidenza che un significativo numero dei geni codificanti per i microRNA sono localizzati in regioni genomiche associate ai tumori, quali siti fragili, regioni minime di perdita di eterozigosità (LOH, *loss of heterozygosity*) a livello delle quali sono frequentemente localizzati geni oncosoppressori, regioni minime di amplificazione dove sono spesso localizzati oncogeni, e regioni di *break-point* [70-74].

Questi studi, inoltre, hanno dimostrato che i microRNA, controllando processi cellulari di importanza fondamentale nella cancerogenesi umana, quali il controllo del ciclo cellulare, il differenziamento, l'apoptosi e l'angiogenesi, possono comportarsi sia come oncogeni che come geni oncosoppressori. Tra gli esempi più studiati di oncogeni possiamo ricordare il *miR-155*, amplificato in molti tumori ematologici, nel tumore del polmone e del seno, e il *cluster miR-17-92*, che comprende sei microRNA over-espressi in diversi tumori solidi e nel linfoma diffuso a cellule B, mentre tra i microRNA oncosoppressori i più studiati, oltre ai già citati *miR-15a* e *miR-16-1* deleti nella leucemia linfatica cronica, possiamo ricordare la famiglia di microRNA *Let-7* e *mir-145* (**Figura 14**) [70-75]. Sorprendentemente, alcuni microRNA, che sono stati ritrovati in regioni soggette ad amplificazione o a delezioni a seconda del tipo di tumore analizzato, possono comportarsi sia da oncosoppressori che da oncogeni a seconda del tipo di alterazione a cui vanno incontro, del tipo cellulare in cui vengono espressi o della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dei loro geni bersaglio [70-74].

MicroRNA	Dysregulation	Function	Validated targets	Oncogene (ONC) or tumour suppressor (TS)
<i>miR-15a</i> and <i>miR-16-1</i>	Loss in CLL, prostate cancer and multiple myeloma	Induces apoptosis and inhibits tumorigenesis	BCL2, WT1, RAB9B and MAGE83	TS
<i>let-7</i> (a, b, c, d, e, f, g and i)	Loss in lung and breast cancer and in various solid and haematopoietic malignancies	Induces apoptosis and inhibits tumorigenesis	RAS, MYC and HMGA2	TS
<i>miR-29</i> (a, b and c)	Loss in aggressive CLL, AML (11q23), MDS lung and breast cancers and cholangiocarcinoma	Induces apoptosis and inhibits tumorigenicity. Reactivates silenced tumour suppressor genes	TCL1, MCL1 and DNMTs	TS
<i>miR-34</i>	Loss in pancreatic, colon, breast and liver cancers	Induces apoptosis	CDK4, CDK6, cyclin E2, EZF3 and MET	TS
<i>miR-145</i>	Loss in breast cancer	Inhibits proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells	ERG	TS
<i>miR-221</i> and <i>miR-222</i>	Loss in erythroblastic leukaemia	Inhibits proliferation in erythroblasts	KIT	TS
<i>miR-221</i> and <i>miR-222</i>	Overexpression in aggressive CLL, thyroid carcinoma and hepatocellular carcinoma	Promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in various solid malignancies	p27, p57, PTEN and TIMP3	ONC
<i>miR-155</i>	Upregulated in aggressive CLL, Burkitt's lymphoma and lung, breast and colon cancers	Induces cell proliferation and leukaemia or lymphoma in mice	MAF and SHIP1	ONC
<i>miR-17-92</i> cluster	Upregulated in lymphomas and in breast, lung, colon, stomach and pancreatic cancers	Induces proliferation	E2F1, BIM and PTEN	ONC
<i>miR-21</i>	Upregulated in glioblastomas, AML (11q23), aggressive CLL and breast, colon, pancreatic, lung, prostate, liver and stomach cancers	Inhibits apoptosis and increases tumorigenicity	PTEN, PDCD4, TPM1 and TIMP3	ONC
<i>miR-372</i> and <i>miR-373</i>	Upregulated in testicular tumours	Promotes tumorigenicity in cooperation with RAS	LATS2	ONC

Figura 14. Principali microRNA oncogeni ed oncosoppressori nei tumori umani.

L'effetto finale delle alterazioni funzionali dei microRNA è l'over-espressione dei geni *target* nei casi di inattivazione e la loro down-regolazione nei casi di attivazione. Qualora i geni *target* dei microRNA deregolati siano coinvolti nella regolazione di

processi biologici come l'apoptosi, il ciclo cellulare, l'invasività o l'angiogenesi, vi sarà un aumentato rischio di crescita incontrollata e di sviluppo di neoplasie. Inoltre, dal momento che un singolo microRNA è in grado di regolare l'espressione genica di numerosi geni bersaglio, la sua alterata espressione può portare alla de-regolazione di numerosi *pathway* molecolari che possono contribuire, separatamente o sinergicamente, all'instaurarsi del fenotipo neoplastico (**Figura 15**) [70-74].

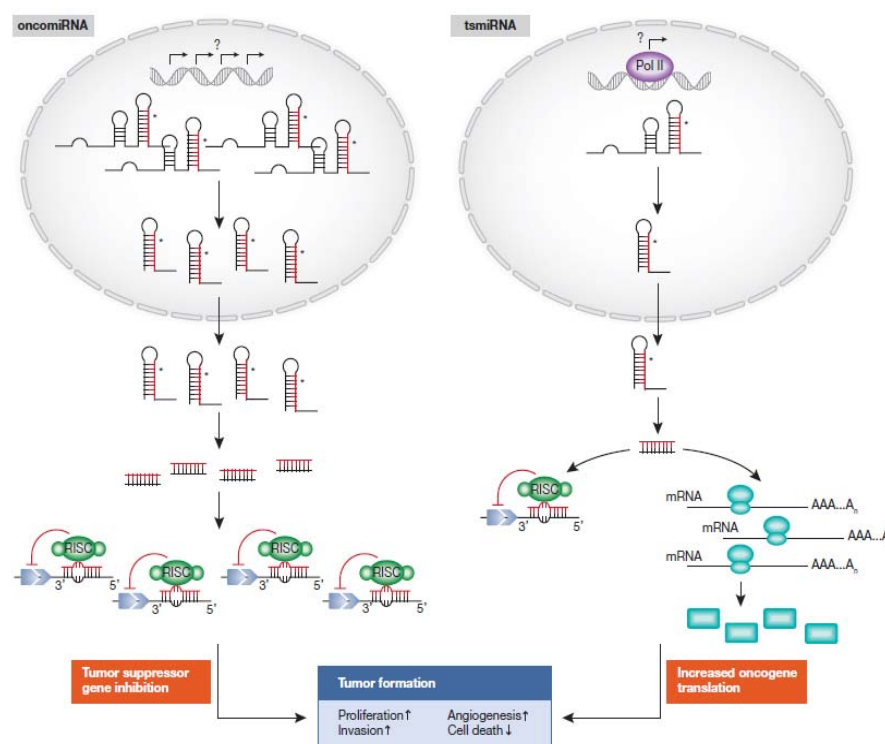


Figura 15. Meccanismo di azione dei microRNA che agiscono come oncogeni (oncomiRNA) e come oncosoppressori (tsmiRNA).

Per quanto riguarda le modificazioni epigenetiche, quali l'alterata metilazione ed acetilazione del DNA, un'estensiva analisi genomica delle sequenze dei geni che codificano per i microRNA ha evidenziato che circa il 50% dei *loci* sono associati con le isole CpG [75], facendo supporre che un alterato stato di metilazione potrebbe essere responsabile della de-regolazione di microRNA nei tumori umani. Ad esempio, è stato osservato che il trattamento di cellule tumorali di cancro alla vescica con un inibitore della DNA metil-transferasi (DNMT), 5-Aza-2'-deossicitidina, determina una significativa up-regolazione di *miR-127*, un microRNA caratterizzato da un promotore che presenta numerose isole CpG, che ha come *target* il proto-oncogene *Bcl6* e che

risulta silenziato in numerosi tumori umani; viceversa, l'over-espressione di microRNA oncogenici può risultare dall'ipometilazione del DNA, come dimostrato per *Let-7a-3* nell'adenocarcinoma del polmone e *miR-21* nel carcinoma ovarico [76].

Il coinvolgimento dei microRNA nello sviluppo e nella progressione tumorale è stato dimostrato anche da numerosi studi che hanno portato all'individuazione di differenti profili di espressione dei microRNA nel tessuto neoplastico rispetto alla sua controparte normale. Nello studio di Volinia e collaboratori [77], un'analisi del profilo di espressione dei microRNA condotta su 540 campioni provenienti da diversi tipi tumorali (polmone, mammella, stomaco, prostata, colon e pancreas) eseguita mediante una metodica di *microarray* ha consentito agli autori di individuare una *signature* di microRNA in grado di accomunare tra loro differenti tumori solidi. A conferma della significatività di questo risultato, la variazione di espressione dei microRNA della *signature* risulta spesso univoca tra i vari tipi di tumore, suggerendo un meccanismo comune di coinvolgimento dei microRNA nella tumorigenesi umana. In aggiunta, all'interno di questa *signature* sono stati ritrovati miRNA di cui era già nota l'associazione con altri tumori umani, tra cui *miR-17-5p*, *miR-20a*, *miR-21*, *miR-92*, *miR-106a*, e *miR-155*, i cui bersagli molecolari risultano significativamente arricchiti in geni oncosoppressori ed oncogeni. Studi di *profiling* analoghi a questo hanno dimostrato che specifici *set* di microRNA sono indicativi del tessuto da cui ha avuto origine la neoplasia, di determinate caratteristiche isto-patologiche e di aggressività, nonché della risposta a determinati trattamenti farmacologici, supportando una possibile applicazione di alcuni microRNA come bio-marcatori utili nella stratificazione dei pazienti sia in fase diagnostica che in fase prognostica [70-74].

Considerando il ruolo chiave svolto dai microRNA nello sviluppo, nella progressione e nel trattamento dei tumori umani, essi sono stati recentemente presi in considerazione come possibili *target* per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle neoplasie umane. Lo scopo dell'utilizzo dei microRNA come *target* terapeutico è quello di andare a modulare processi chiave nell'iniziazione e nella progressione tumorale, quali ad esempio la proliferazione cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi e l'invasione, tramite l'introduzione dei microRNA oncosoppressori nei tumori in cui questi sono stati persi e l'inibizione dell'espressione dei microRNA oncogeni nei tumori

in cui questi risultano over-espressi tramite molecole antagoniste dette **ANTAGOMIR** (**Figura 16**) [76,78].

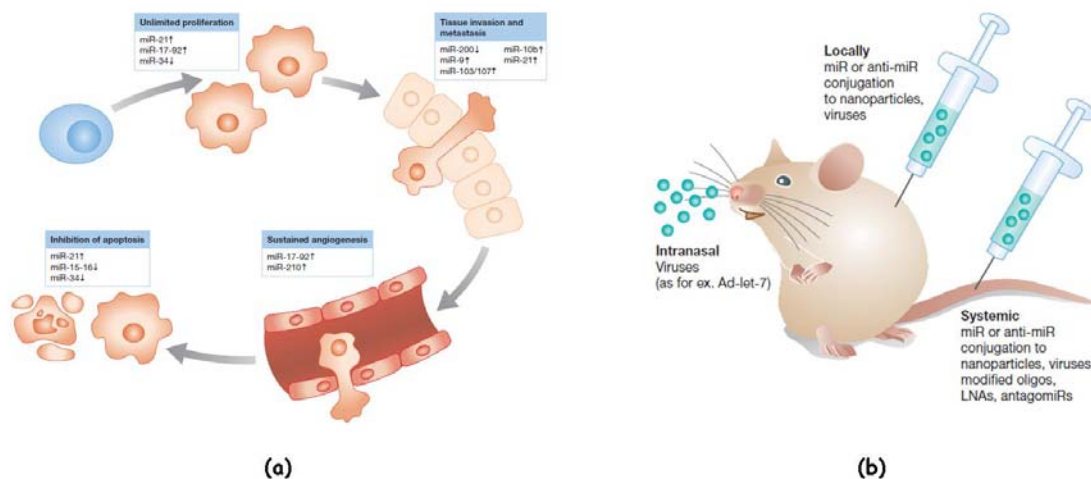


Figura 16. Utilizzo dei microRNA come *target* terapeutici. **(a)** Processi cellulari e microRNA studiati come possibili bersagli terapeutici e **(b)** approcci terapeutici attualmente utilizzati per il *targeting* dei microRNA *in vivo*.

Il razionale su cui si fonda questo approccio terapeutico si basa sul fatto che i microRNA sono molecole endogene con azione di antisenso in grado di regolare l'espressione di numerosi geni coinvolti nella sopravvivenza, proliferazione e differenziamento delle cellule, per cui l'introduzione dei microRNA oncosoppressori o degli antagomiR, che può avvenire tramite vettori adenovirali, retrovirali o tramite la coniugazione degli oligonucleotidi con delle molecole lipofile, determina l'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi come dimostrato per esempio nella leucemia linfatica cronica da esperimenti *in vivo* in modelli di *xenograft* (**Figura 16**) [76,78].

Inoltre, per i tumori in cui si assiste a un silenziamento epigenetico dei geni dei microRNA oncosoppressori non è difficile immaginare una terapia basata sull'introduzione di microRNA che controllano le DNMT, come ad esempio i membri della famiglia *miR-29* [76,78].

2.6 Ruolo dei microRNA nei carcinomi del polmone

Il primo studio a correlare il profilo di espressione dei microRNA ai carcinomi del polmone è stato quello di Takamizawa e collaboratori [79], che analizzando 143 pazienti affetti da carcinoma del polmone hanno identificato in ***Let-7*** il primo microRNA espresso in maniera aberrante nei carcinomi del polmone. Questi ricercatori hanno dimostrato che circa il 40% dei tumori analizzati presentava una bassa espressione di *Let-7* e che la ridotta espressione di questo microRNA era correlata con una ridotta sopravvivenza globale dei pazienti. Successivamente, Johnson e collaboratori hanno dimostrato che l'espressione di *Let-7* è inversamente correlata all'espressione di K-Ras [80] e che l'over-espressione di questo microRNA nella linea cellulare A549 di adenocarcinoma del polmone inibisce la crescita cellulare e determina un blocco della progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare [81]. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che tutti i membri della famiglia *Let-7* di microRNA regolano negativamente l'espressione di diversi oncogeni, come ad esempio *c-Myc* ed i geni *RAS*, le cui regioni 3' UTR contengono siti multipli di legame per *Let-7*, e di fattori che regolano la progressione del ciclo cellulare, quali *CDK6*, *CDC25A* e la *ciclina D2*, facendo supporre un ruolo da oncosoppressore per questo microRNA [82-84].

Recentemente, sono stati descritti altri microRNA che sembrano svolgere un ruolo da oncosoppressore nei carcinomi del polmone, tra cui possiamo ricordare ***miR-212***, la cui espressione è inversamente correlata all'espressione del fattore anti-apoptotico PED/PEA-12 frequentemente over-espresso nei carcinomi del polmone, e ***miR-192***, la cui over-espressione in diverse linee cellulari di carcinoma polmonare determina un'inibizione della proliferazione cellulare e una riduzione della crescita tumorale in modelli sperimentali di carcinoma del polmone in topi nudi dovute alla down-regolazione dell'espressione del gene *Rb1* [85-87].

Accanto ai microRNA con un ruolo di oncosoppressore, nel carcinoma del polmone sono stati descritti numerosi microRNA che agiscono come oncogeni, tra i quali quelli più importanti sono sicuramente i microRNA del *cluster miR-17-92* e *miR-21*, a causa delle numerose implicazioni che la loro de-regolata espressione determina ai fini dell'iniziazione e della progressione del carcinoma del polmone [85-87].

Il ***cluster miR-17-92*** comprende sei microRNA (*miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b-1* e *miR-92-1*) ed è localizzato sul cromosoma 13q31.3, una regione che

nei carcinomi del polmone va frequentemente incontro a fenomeni di amplificazione genica. Il *cluster miR-17-92* risulta spesso overespresso nei carcinomi del polmone e promuove la differenziazione cellulare, la crescita cellulare e l'angiogenesi. Grazie a studi condotti in cellule tumorali polmonari che over-esprimono il *cluster miR-17-92* è stato dimostrato che i membri di questo *cluster* agiscono in sinergia con c-Myc ed E2F1 per promuovere la crescita tumorale e l'angiogenesi [84,88].

L'espressione ***miR-21*** è invece de-regolata in diverse neoplasie umane ed è frequentemente over-espresso nei carcinomi del polmone [85-87]. L'over-espressione di *miR-21* favorisce la progressione dei carcinomi polmonari abolendo l'espressione di numerosi geni oncosoppressori, tra i quali particolare interesse è rivestito da *PDCD4* [89] e *PTEN* [90]. Studi *in vitro* mostrano come l'inibizione di *miR-21* sia associata ad un'aumentata espressione di PDCD4, a cui consegue un aumento dell'induzione dell'apoptosi [89], e di PTEN, che determina una diminuita proliferazione cellulare ed invasione delle cellule tumorali [90]. Inoltre, l'inibizione di *miR-21* induce un'alterata espressione delle metallo-proteinasi MMP2 e MMP9 che svolgono un ruolo molto importante nei processi di migrazione ed invasione [91].

Le evidenze sperimentali raccolte fino ad oggi dimostrano che i microRNA sono espressi in modo specifico dai diversi tessuti umani e alterazioni del profilo di espressione nei differenti tipi di tumore sono correlate a specifiche caratteristiche biologiche e patologiche dei tumori, all'esito della malattia e alla risposta al trattamento farmacologico, e che essi possono rappresentare dei validi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi nei tumori umani [71-74]. Nell'ambito della patologia tumorale polmonare, i microRNA essendo isolabili non solo dai tessuti ma anche dai fluidi corporei, come ad esempio sangue, saliva, sputo e lavaggi bronco-alveolari, potrebbero rappresentare dei bio-marcatori non invasivi e più efficaci in una patologia che mostra tassi di ricorrenza e mortalità molto elevati [1-3], permettendo di effettuare diagnosi precoci e di identificare i pazienti a peggior prognosi in modo da indirizzarli verso trattamenti più severi.

2.6.1 I microRNA come marcatori diagnostici nel carcinoma del polmone

L'analisi dei profili di espressione dei microRNA nei campioni tumorali di polmone rispetto alla loro controparte sana ha recentemente messo in evidenza il potenziale

diagnostico dei microRNA nell'individuare un determinato fenotipo tumorale. Ad esempio, Yanaihara e collaboratori [92], comparando l'espressione di un ampio pannello di microRNA in 104 coppie di tumori primitivi del polmone e dei corrispondenti tessuti polmonari non tumorali mediante la metodica del *microarray*, hanno identificato 43 microRNA differenzialmente espressi tra i due tipi di tessuti, tra cui diversi microRNA oncosoppressori, come ***miR-192*** e ***miR-212***, ed oncogeni, quali ***miR-21***, ***miR-191***, ***miR-155*** e ***miR-210***.

Tuttavia, la caratterizzazione del profilo di espressione dei microRNA, oltre a stabilire l'origine polmonare di una determinata neoplasia, può fornire informazioni utili ai fini della classificazione istologica dei carcinomi del polmone, soprattutto nei casi in cui le piccole biopsie e gli agoaspirati forniscono materiale spesso esiguo su cui effettuare la diagnosi o nei casi di tumori poco differenziati difficili da classificare. Inoltre, l'accurata classificazione dei carcinomi del polmone in ADC e SCC ha recentemente assunto un'importanza fondamentale ai fini della scelta dell'approccio terapeutico da adottare per i pazienti con NSCLC, in quanto permette di indirizzare i pazienti con ADC verso terapie a bersaglio molecolare con i TKI.

Diversi studi hanno mostrato come il diverso profilo di espressione dei microRNA sia in grado di discriminare con elevati gradi di accuratezza e sensibilità diagnostica non solo gli SCLC dai NSCLC [93], ma anche di fornire un'accurata classificazione dei NSCLC nei diversi sottotipi istologici. Ad esempio, Lebanony e collaboratori [94] analizzando 122 campioni di ADC ed altrettanti campioni di SCC mediante *Real-time* PCR hanno dimostrato che il microRNA ***miR-205*** è in grado di differenziare i SCC dagli ADC con una sensibilità del 96% e una specificità del 90% anche in piccole biopsie di tumori poco differenziati. Più recentemente, Landi e collaboratori [95] in uno studio più ampio che analizzava il profilo di espressione di 440 microRNA maturi in 165 casi di ADC e 125 casi di SCC mediante la tecnologia dei *microarray* hanno identificato una *signature* di cinque microRNA (***miR-25***, ***miR-34c***, ***miR-191***, ***miR-34a*** e ***Let-7e***), che differenzia in modo accurato i SCC dagli ADC e hanno dimostrato che bassi livelli di espressione di tali microRNA sono correlati ad una prognosi peggiore nei pazienti con SCC.

2.6.2 I microRNA come marcatori prognostici nel carcinoma del polmone

La stratificazione dei pazienti in base ai fattori prognostici ed ai fattori che aumentano il rischio di sviluppare una determinata neoplasia è diventata oggi di fondamentale importanza nel *management* dei pazienti oncologici. Per il carcinoma del polmone sono numerosi gli studi che negli ultimi anni hanno cercato di correlare il profilo di espressione dei microRNA con la prognosi dei pazienti con carcinoma del polmone dimostrando una stretta correlazione tra la sopravvivenza dei pazienti e l'up-regolazione o la down-regolazione di diversi microRNA.

Yanaihara e collaboratori [92] hanno riportato che un'alta espressione di **miR-155** e una bassa espressione di **Let-7a** correla con una ridotta sopravvivenza globale nei pazienti con adenocarcinoma del polmone. Successivamente, Yu e collaboratori [96] analizzando una coorte di 122 pazienti affetti da NSCLC hanno identificato una *signature* di cinque microRNA (**miR-137**, **miR-372**, **miR-182***, **miR-221** e **Let-7a**) che permette di identificare i pazienti con un intervallo libero da malattia più breve, mentre Raponi e collaboratori [97] hanno mostrato che alti livelli di espressione di **miR-146b** e di **miR-155** sono correlati ad una ridotta sopravvivenza globale nei pazienti con SCC.

Un ruolo importante come marcatore prognostico nel carcinoma del polmone è svolto anche da **miR-21**, la cui over-espressione sembra essere un fattore prognostico negativo indipendente per la sopravvivenza globale nei pazienti con NSCLC [98,99].

2.6.3 I microRNA come marcatori predittivi nel carcinoma del polmone

Negli ultimi anni la miglior comprensione delle basi molecolari dei carcinomi del polmone ha determinato un notevole cambiamento nell'approccio terapeutico dei pazienti che presentano mutazioni attivanti nel gene *EGFR*, i quali possono beneficiare di terapie a bersaglio molecolare che prevedono l'utilizzo di inibitori dell'attività tirosin-chinasica di EGFR, quali ad esempio il Gefitinib® e l'Erlotinib® [12-15].

Molti studi hanno recentemente messo in evidenza una stretta relazione tra i microRNA e l'espressione del gene *EGFR* che risulta regolata da numerosi microRNA, tra i quali quelli più importanti sono:

- **miR-128b**, un regolatore diretto di EGFR, la cui LOH si osserva frequentemente nei pazienti con carcinoma del polmone. L'espressione di questo microRNA è

correlata positivamente con la risposta clinica e la sopravvivenza globale dei pazienti trattati con Gefitinib®.

- **miR-145**, un microRNA oncosoppressore, che inibisce la crescita cellulare in pazienti con ADC che presentano mutazioni attivanti a livello del dominio tirosin-chinasico del gene *EGFR*.
- **miR-7**, che è spesso down-regolato nei carcinomi del polmone ed è stato dimostrato essere un regolatore negativo del *pathway* di segnalazione cellulare controllato da EGFR tramite l'inibizione dell'espressione dei geni *EGFR*, *Raf1*, *Akt* ed *ERK* [85-87].

Un ruolo predittivo importante è stato ipotizzato anche per **miR-21**. Infatti, l'espressione di *miR-21* è up-regolata in condizioni in cui il *pathway* di EGFR è attivato, mentre l'inibizione di EGFR ad opera dei TKI determina una riduzione dell'espressione di *miR-21* nei pazienti non fumatori con ADC [100].

Uno dei fattori più importanti che influisce sulla probabilità di sopravvivenza dei pazienti neoplastici è la resistenza ai trattamenti farmacologici. In base alla loro tossicità specifica contro le cellule maligne, diverse forme ricombinanti di TRAIL risultano tra i più promettenti agenti anti-tumoral basati sull'induzione di apoptosi nelle cellule cancerose, nonostante in alcuni casi venga osservata una resistenza il cui meccanismo è ad oggi ancora poco chiaro. Garofano e collaboratori [101] hanno dimostrato che **miR-221** e **miR-222** sono over-espressi nei NSCLC, inducono resistenza al trattamento con TRAIL ricombinante attraverso la regolazione di PTEN e TIMP3, ed aumentano la migrazione cellulare in seguito all'attivazione del *pathway* PI3K/Akt e delle metallo-peptidasi.

SCOPO DELLA TESI

Il carcinoma del polmone rappresenta la prima causa di morte per neoplasia nei paesi Occidentali. Nonostante i progressi raggiunti sia nelle procedure diagnostiche che negli approcci terapeutici, la maggior parte dei casi di carcinoma del polmone viene diagnosticata nelle fasi più avanzate della malattia, in cui le possibilità di intervento terapeutico sono drammaticamente ridotte. Appare quindi evidente la necessità di individuare per questa neoplasia nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi, che permettano di stabilire delle diagnosi accurate e precoci e di individuare dei trattamenti terapeutici sempre più personalizzati ed efficaci.

Negli ultimi anni, la scoperta dei microRNA ha messo in luce un nuovo e fine meccanismo di regolazione post-trascrizionale che interviene in processi cellulari fondamentali, quali lo sviluppo, il differenziamento, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la risposta ai segnali extracellulari e agli stress di varia natura. I microRNA, inoltre, svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi e nella progressione di numerose neoplasie umane, incluso il carcinoma del polmone.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare mediante *Real-time* PCR il profilo di espressione di due microRNA, *Let-7g* e *miR-21*, in una serie di pazienti con NSCLC al fine di stabilirne una loro eventuale de-regolazione, di identificare possibili relazioni tra l'espressione di tali microRNA e le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, e di valutarne un loro eventuale impiego come marcatori diagnostici, prognostici e predittivi.

MATERIALI E METODI

1. Selezione dei pazienti e caratteristiche dei tumori

Questo studio è stato condotto su 80 pazienti affetti da NSCLC operati presso il Dipartimento di Chirurgia Cardio-Toracica dell'Università di Pisa tra il 2005 e il 2012.

La diagnosi istologica è stata effettuata indipendentemente da due patologi (G.F. e G.A.) e formulata in accordo alla classificazione del *World Health Organization* (WHO) 2004 [2]. Le diagnosi discordanti sono state rivalutate congiuntamente e discusse fino al raggiungimento di un accordo.

L'età media dei pazienti alla diagnosi è stata di 67 anni, compresa in un intervallo da 46 a 85 anni. Per tutti i pazienti, i dati clinico-patologici disponibili, quali l'età alla diagnosi, il sesso, l'istologia, le dimensioni del tumore e lo stato linfonodale sono stati raccolti e sono riassunti nella **Tabella I**.

Caratteristiche clinico-patologiche	n (%)
Età	
≤67 anni	38 (47.5)
>67 anni	42 (52.5)
Sesso	
Maschi	55 (68.8)
Femmine	25 (31.2)
Istologia	
ADC	55 (68.8)
SCC	21 (26.2)
LCC	2 (2.5)
Altri istotipi	2 (2.5)
Dimensioni tumore	
T1 (T1a-T1b)	12 (19.0)
T2 (T2a-T2b)	31 (49.3)
T3	14 (22.2)
T4	6 (9.5)
Stato linfonodale	
Negativo	19 (33.3)
Positivo	38 (66.7)

Tabella I. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC. I dati sono indicati come *n* (%). *ADC*, Adenocarcinoma; *SCC*, Carcinoma squamoso; *LCC*, Carcinoma a grandi cellule.

Le analisi molecolari sono state condotte su un totale di 82 campioni tumorali e 27 campioni normali, costituiti da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*FFPE*,

Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded) e/o preparati citologici, *brushing* bronchiali o agoaspirati bronchiali con ago sottile (FNA, *Fine-needle aspiration*), presenti nell'istoteca dell'Anatomia Patologica III dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana. Per due degli 80 pazienti arruolati in questo studio abbiamo avuto a disposizione sia il preparato citologico pre-operatorio che il preparato istologico post-operatorio.

Per 42 degli 80 pazienti inseriti in questo studio è stato inoltre possibile ottenere delle informazioni relative all'abitudine al fumo, al *performance status* (PS) espresso secondo la scala dell'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG-PS), alla risposta alla terapia con i TKI Erlotinib® e Gefitinib® secondo i criteri RECIST (*Response evaluation criteria in solid tumors*), alla ricorrenza della malattia e alla mortalità. La durata media del *follow-up* è stato di 38 mesi e 25 dei 42 pazienti hanno mostrato una ricomparsa della malattia dopo trattamento con TKI (**Tabella II**).

Caratteristiche cliniche	n (%)
Stato di fumatore	
<i>Never smoking</i>	13 (31.7)
<i>Former smoking</i>	26 (63.4)
<i>Current smoking</i>	2 (4.9)
ECOG-PS	
0	11 (26.2)
1	29 (69.0)
2	2 (4.8)
Risposta al trattamento con TKI	
Risposta completa	1 (2.6)
Risposta parziale	18 (47.4)
Malattia stabile	10 (26.3)
Progressione di malattia	9 (23.7)
Ricorrenza della malattia	
Nessuna evidenza di malattia	17 (40.5)
Progressione di malattia	25 (59.5)

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei pazienti con NSCLC. I dati sono indicati come *n* (%).

2. Analisi dell'espressione dei microRNA

2.1 Estrazione e purificazione dell'RNA

L'RNA totale dai campioni normali e tumorali è stato isolato a partire da sezioni di 10 µm di tessuto FFPE o dai preparati citologici a seconda della disponibilità del materiale utilizzando il *miRNeasy FFPE Kit* (Qiagen), che consente un recupero

ottimale dell'RNA totale arricchito degli RNA a basso peso molecolare (≥ 18 nucleotidi), quali microRNA e snRNA.

Prima della digestione dei tessuti, le sezioni di tessuto FFPE ed i preparati citologici sono stati sottoposti ad un trattamento in xilolo al fine di rimuovere rispettivamente la paraffina e il vetrino copri-oggetto ed a un lavaggio in etanolo assoluto per rimuovere le tracce di xilolo residue, e lasciati asciugare a temperatura ambiente fino alla completa evaporazione dell'etanolo. Il tessuto tumorale è stato quindi isolato mediante macrodissezione manuale dell'area tumorale in modo da avere una percentuale di cellule tumorali superiore al 70%.

La digestione del tessuto è stata effettuata mediante un trattamento a 56°C per 15 minuti con 150 μ l di *Buffer* PKD, ottimizzato per l'isolamento dell'RNA totale dalle sezioni di tessuto FFPE, e 10 μ l di Proteinasi K (>600 mAU/ml), seguito da un'incubazione per 15 minuti a 80°C, che permette di revertire l'effetto di *cross-linking* della formalina.

I campioni sono stati quindi incubati in ghiaccio per 3 minuti e centrifugati per 15 minuti a 13.500 rpm in modo da rimuovere i frammenti di tessuto insolubili e il DNA *cross-linked* che si depositano nel *pellet*. Dopo aver trasferito il supernatante in un nuovo tubo da micro-centrifuga, è stato effettuato un trattamento per 15 minuti a temperatura ambiente con 10 μ l di DNasi I (≥ 2700 U/ml), che rimuove in modo efficace le contaminazioni da parte del DNA genomico, incluso le molecole di DNA altamente frammentate che spesso si riscontrano nei campioni FFPE dopo fissazione prolungata in formalina e/o lunghi periodi di conservazione.

Il lisato è stato quindi addizionato con 320 μ l di *Buffer* RBC e 1120 μ l di etanolo assoluto per creare le appropriate condizioni di legame e trasferito nelle colonnine *RNeasy MinElute spin*, a cui si lega l'RNA totale ma non i contaminanti che vengono efficacemente eliminati mediante brevi centrifugazioni per 15 secondi a 10.000 rpm. Dopo due successivi lavaggi con 500 μ l di *Buffer* RPE, l'RNA totale è stato eluito in 30 μ l di acqua *RNase-free* e conservato a -80°C fino al successivo utilizzo.

La resa quantitativa dell'RNA estratto è stata valutata mediante lo spettrofotometro UV-visibile *NanoDrop*[®] *ND-1000* (Celbio), che utilizza come sorgente luminosa una lampada a Xenon, e permette di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione con accuratezza e riproducibilità elevate.

La lettura spettrofotometrica ha inoltre reso possibile valutare la purezza dell'RNA estratto mediante la valutazione dei rapporti di assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , indici rispettivamente della contaminazione dell'RNA da proteine e da altri contaminanti, quali fenoli e carboidrati, che devono assumere valori compresi tra 1.8 e 2.0.

Tutti i campioni sono stati normalizzati per le successive analisi ad una concentrazione di lavoro di 2 ng/ μ l.

2.2 Analisi dell'espressione dei microRNA

L'analisi dell'espressione dei microRNA nei campioni di tessuto normale e tumorale è stata eseguita mediante *Real-time Polymerase Chain Reaction* (PCR) utilizzando specifici TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems), che permettono di identificare e quantificare l'espressione dei soli microRNA maturi (**Figura 1**).

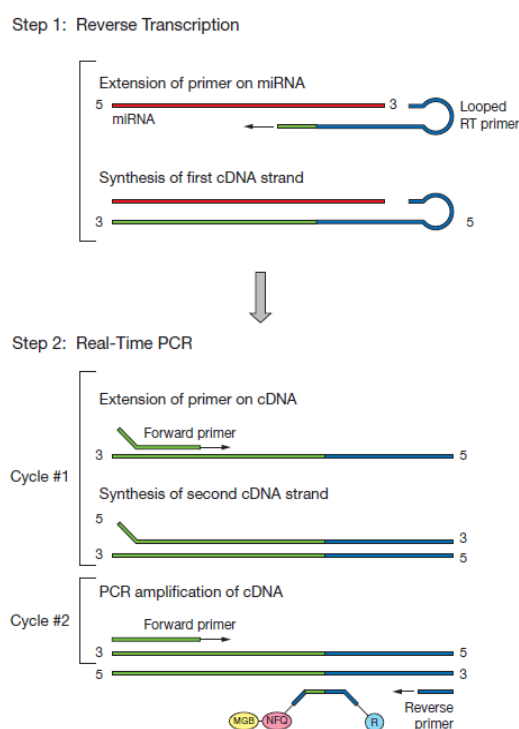


Figura 1. Quantificazione dei microRNA maturi mediante i TaqMan[®] MicroRNA Assays.

La quantificazione dell'espressione dei microRNA mediante i TaqMan[®] MicroRNA Assays prevede due fasi successive (**Figura 1**):

- **RETROTRASCRIZIONE** dell'RNA totale utilizzando dei primers *stem-loop* specifici per il microRNA di interesse, i quali sono dotati di una coda a forcina complementare ad uno dei primer di PCR;
- **REAL-TIME PCR** con sonde TaqMan[®] MGB (*Minor groove binder*) specifiche.

2.2.1 Retrotrascrizione dei microRNA

I microRNA *Let-7g* e *miR-21* oggetto di questo studio e il microRNA *RNU6B* utilizzato come controllo endogeno di espressione sono stati retrotrascritti a partire da 10 ng di RNA totale utilizzando il TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) e specifici primers di retrotrascrizione forniti dai TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems).

Le reazioni di retrotrascrizione sono state allestite in ghiaccio in un volume finale di 15 µl, contenente 10 ng di RNA totale, 1.5 µl di 10X Reverse Transcription Buffer, 0.15 µl di 100 mM dNTPs (con dTTP), 0.19 µl di *RNase Inhibitor* 20 U/µl, 1 µl di *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* 50 U/µl, 3 µl di 5X RT primer (Applied Biosystems), e acqua *RNase-free* a volume. Dopo aver incubato i campioni in ghiaccio per 5 minuti, la reazione di retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando un termocicizzatore T3000 *Thermocycler* 48 (Biometra) secondo il protocollo riportato in **Tabella III**.

<i>Step</i>	Temperatura	Tempo
1	16°C	30 minuti
2	42°C	30 minuti
3	85°C	5 minuti
4	4°C	∞

Tabella III. Protocollo di retrotrascrizione.

2.2.2 Quantificazione dei microRNA mediante Real-time PCR

L'analisi dell'espressione dei microRNA è stata eseguita utilizzando delle sonde TaqMan[®] MGB specifiche fornite dai TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Le sonde TaqMan[®] MGB sono disegnate in modo da ibridarsi all'interno del frammento di interesse amplificato nella reazione di PCR e presentano all'estremità

5' un *reporter* fluorescente ed all'estremità 3' un *quencher* non fluorescente (NFQ) ed un MGB, che conferisce alla sonda una maggiore temperatura di *melting*, caratteristica fondamentale per conservare un'alta specificità di legame in una sonda di breve lunghezza come quella utilizzata in questo tipo di saggio.

Durante la PCR, la sonda TaqMan[®] MGB si lega specificamente alla sequenza complementare all'interno della sequenza amplificata dai primers di PCR, ma la vicinanza del reporter fluorescente all'NFQ determina un'inibizione della fluorescenza del *reporter*. Durante il processo di amplificazione, l'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi degrada esclusivamente le sonde ibridate al *target* e ciò determina la separazione del *reporter* fluorescente dall'NFQ con una conseguente emissione di fluorescenza (**Figura 2**).

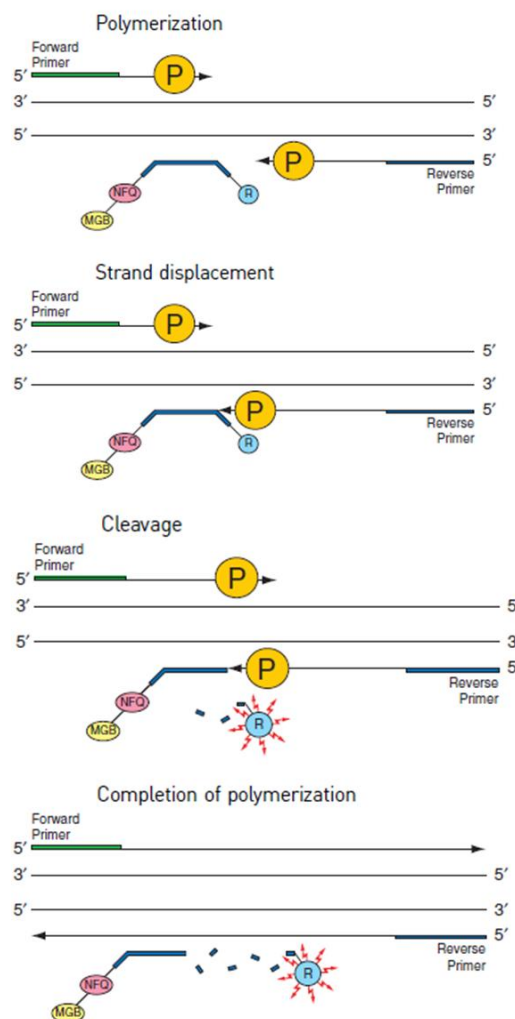


Figura 2. Meccanismo di emissione della fluorescenza mediante le sonde TaqMan[®] MGB.

Le reazioni quantitative di *Real-time* PCR sono state eseguite per ciascun campione in triplicato in un volume finale di 20 µl, contenente 1.3 µl del prodotto di retrotrascrizione, 1 µl di 20X TaqMan[®] MicroRNA Assay (Applied Biosystems), 10 µl di 2X TaqMan[®] Universal PCR Master Mix II no UGN (Applied Biosystems) e acqua *RNase-free* a volume, e sono state effettuate utilizzando lo strumento *Rotor-Gene* 6000 (Corbett Research) secondo il protocollo riportato nella **Tabella IV** selezionando il *gain* 8 per l'acquisizione del segnale nel canale *Green*.

<i>Step</i>	N° Cicli	Fase	Temperatura	Tempo
Attivazione Taq Polimerasi	1		95°C	10 minuti
PCR	40	Denaturazione	95°C	15 secondi
		<i>Annealing</i> /Estensione	60°C	1 minuto

Tabella IV. Ciclo di amplificazione dei microRNA mediante *Real-time* PCR.

I dati ottenuti sono stati analizzati con il *software* DataAssistTM (Applied Biosystems). Per ciascun campione, l'espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* è stata normalizzata con quella del controllo endogeno di espressione *RNU6B*, mentre l'espressione relativa (*Fold Change*) dei campioni tumorali rispetto ai campioni normali è stata calcolata con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.2.3 Predizione bioinformatica dei target di microRNA

I target molecolari dei microRNA deregolati sono stati identificati utilizzando i *software* miRanda versione 3.0 (<http://www.microrna.org/microrna>), TargetScan versione 5.2 (<http://www.targetscan.org>), Pictar (<http://www.pictar.org>) e miRDB versione 4.0 (<http://mirdb.org>) accessibili liberamente *on line*.

I target predetti sono stati classificati e raggruppati in base alla loro funzione molecolare e al processo biologico nel quale sono coinvolti mediante il *software* di analisi *Gene Ontology* PANTHER (<http://www.pantherdb.org>).

3. Analisi genetica

3.1 Estrazione e purificazione del DNA

Il DNA genomico è stato isolato a partire da sezioni di 10 µm di tessuto FFPE o dal preparato citologico a seconda della disponibilità del materiale mediante il QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen), che sfrutta la proprietà del DNA di legarsi specificamente a supporti inerti di silice contenuti in colonnine che permettono l'isolamento del DNA e l'eliminazione dell'RNA e delle proteine.

La digestione del tessuto è stata preceduta per le sezioni di tessuto FFPE da un trattamento in xilolo al fine di rimuovere la paraffina, e da un processo di reidratazione attraverso una serie di alcool a concentrazioni decrescenti (100%, 95%, 70%, 50% e acqua distillata) per entrambi i tipi di materiali utilizzati in questo studio. Il tessuto tumorale è stato isolato mediante macrodissezione manuale dell'area tumorale in modo da avere una percentuale di cellule tumorali $\geq 70\%$.

La digestione del tessuto è stata effettuata mediante incubazione *over-night* a 56°C in una soluzione di pre-lisi costituita da 180 µl di *Buffer* ATL e 20 µl di Proteinasi K con attività >600 mAU/ml, seguita da un'incubazione a 70°C per 10 minuti in 200 µl di *Buffer* AL di lisi contenente agenti caotropici.

La purificazione del DNA è avvenuta mediante precipitazione degli acidi nucleici con 200 µl di etanolo assoluto e adsorbimento sulle membrane di silice delle colonnine QIAamp Mini *Spin* mediante una breve centrifugazione (8.000 rpm per 1 minuto). Le condizioni saline e di pH presenti nel lisato assicurano che le proteine e gli altri contaminanti in esso presenti che potrebbero inibire le analisi successive non vengano trattenute dalle membrane delle colonnine QIAamp Mini *Spin*.

Il DNA estratto è stato quindi sottoposto a due successivi lavaggi con i *Buffer* AW1 (8.000 rpm per 1 minuto) e AW2 (13.000 rpm per 3 minuti), che assicurano la completa rimozione di ogni contaminante residuo senza inficiare il legame del DNA alla membrana di silice della colonnina e aumentandone significativamente la purezza.

Il DNA purificato è stato infine eluito dalla colonnina QIAamp Mini *Spin* utilizzando un *Buffer* AE di eluizione (10 mM Tris-HCl/0.5 mM EDTA, pH 9.0) dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente.

La resa quantitativa e qualitativa del DNA estratto è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica al *NanoDrop*[®] *ND-1000* (Celbio) e tutti i campioni sono stati normalizzati per le successive analisi ad una concentrazione di lavoro di 20 ng/μl.

3.2 Analisi mutazionale del gene *EGFR*

L'analisi mutazionale degli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene *EGFR* (Sequenza di riferimento ENSG00000146648) codificanti per il dominio tirosin-chinasico di EGFR è stata effettuata mediante amplificazione con PCR, seguita da uno screening mutazionale di primo livello mediante la metodica del *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) e dalla caratterizzazione delle mutazioni eventualmente identificate mediante sequenziamento genomico diretto.

3.2.1 Amplificazione del gene *EGFR* mediante PCR

Gli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene *EGFR* sono stati amplificati mediante PCR utilizzando una coppia di *primers* specifica per ciascun esone disegnata mediante il *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Tabella V).

Primers di PCR usati per l'analisi mutazionale del gene <i>EGFR</i>			
Esone	<i>Primer forward</i> (5'→3')	<i>Primer reverse</i> (5'→3')	Dimensioni Amplicone
18	CTCTGTGTTCTTGTCCTCC	GCCTGTGCCAGGGACCTTAC	166 bp
19	CATGTGGCACCATCTCACA	CCACACAGCAAAGCAGAAAC	179 bp
20	CACACTGACGTGCCTCTCC	TATCTCCCCTCCCCGTATCT	250 bp
21	CCTCACAGCAGGGTCTTCTC	CCTGGTGTGTCAGGAAAATGCT	229 bp

Tabella V. Primers utilizzati per l'amplificazione degli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene *EGFR* mediante PCR.

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume finale di 25 μl, contenente 100 ng di DNA genomico, 2.5 μl di 10X PCR *Buffer*, 2 μl di 25 mM MgCl₂, 2 μl di 10 mM dNTPs, 0.5 μl di una soluzione 20 μM di ciascun *primer*, 0.2 μl di FastStart Taq DNA Polimerasi 5 U/μl (Roche Diagnostics) e acqua *DNase-free* a

volume. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando un termocicizzatore T3000 *Thermocycler* 48 (Biometra) secondo il protocollo di amplificazione riportato nella **Tabella VI**.

<i>Step</i>	N° Cicli	Fase	Temperatura	Tempo
Attivazione Taq Polimerasi	1		95°C	4 minuti
Amplificazione	40	Denaturazione	95°C	30 secondi
		<i>Annealing</i>	58°C	30 secondi
		Estensione	72°C	45 secondi
Estensione Finale	1		72°C	10 minuti

Tabella IVI. Ciclo di PCR utilizzato per amplificare gli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene *EGFR*.

L'efficienza e la specificità della reazione di amplificazione sono state quindi confermate mediante separazione elettroforetica su un gel d'agarosio all'1.5% in un tampone 0.5X TBE contenente 0.5 mg/μl bromuro di etidio, e le bande relative ai prodotti di PCR sono state visualizzate mediante una lampada UV.

3.2.2 SSCP

La metodica SSCP si basa sulla proprietà del DNA a singolo filamento di assumere in un gel di poli-acrilammide non denaturante una struttura secondaria specifica dipendente dalla sequenza nucleotidica del frammento stesso. Pertanto, frammenti di DNA che differiscono anche solo per una singola base nucleotidica mostreranno una differente mobilità elettroforetica ed assumeranno dei *pattern* di migrazione differenti, permettendo di discriminare i campioni *wild type* da quelli mutati (**Figura 3**).

I prodotti di PCR sono stati miscelati in un rapporto 1:1 con HiDi Formammide (Applied Biosystems), denaturati a 95°C per 5 minuti per ottenere molecole di DNA a singolo filamento e quindi posti immediatamente in ghiaccio per impedire il riappaimento dei singoli filamenti di DNA.

La separazione elettroforetica è stata effettuata utilizzando un gel di poli-acrilammide al 12.5% (Gene Gel Excel 12.5/24, GE Healthcare) in condizioni non denaturanti a temperatura (18°C) e amperaggio (25 mA) costanti per 1 h 40 minuti (**Figura 3**).

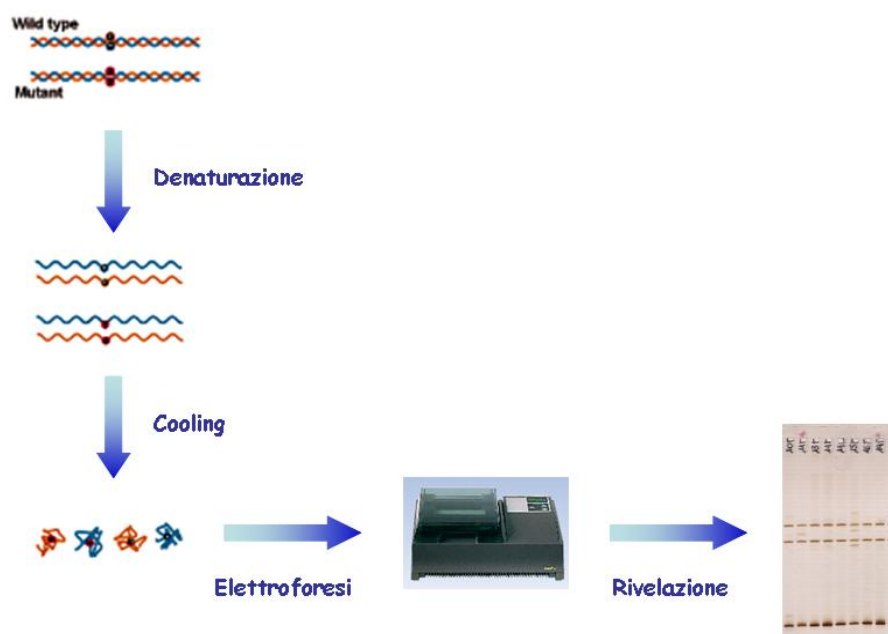


Figura 3. Metodica SSCP.

Successivamente, i frammenti di DNA a singolo filamento sono stati visualizzati mediante colorazione con nitrato d'argento utilizzando il sistema di rivelazione *PlusOne DNA Silver Staining Kit* (GE Healthcare).

La procedura di colorazione prevede una prima fase di fissaggio per 30 minuti in agitazione in una soluzione al 3% w/v di acido benzen sulfonico in alcool al 24%, seguita da una fase di colorazione con una soluzione colorante costituita dall'1% w/v nitrato di argento (AgNO_3), 0.35% w/v di acido benzen sulfonico in acqua bi-distillata (ddH_2O) per 30 minuti in agitazione. Successivamente, il gel è stato lavato con ddH_2O e immerso in una soluzione di sviluppo costituita da 12.5% w/v di carbonato di sodio (Na_2CO_3), formaldeide al 37% e 2% w/v di sodio tiosolfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) fino alla comparsa delle bande. La reazione di sviluppo è stata infine bloccata immergendo il gel in una soluzione di blocco e preservazione contenente il 5% v/v acido acetico, 24% v/v acetato di sodio e 50% v/v glicerolo.

I campioni con un profilo di migrazione differente da quello di un campione di riferimento *wild type* sono stati sottoposti ad ulteriori analisi mediante sequenziamento genomico diretto per rivelare la presenza di eventuali mutazioni.

3.2.3 Sequenziamento genomico diretto

Il metodo di sequenziamento genomico diretto si basa sul metodo di terminazione della catena sviluppato da Frederick Sanger nel 1977 [102] ed ha rappresentato negli ultimi trenta anni il metodo *gold standard* per il sequenziamento del DNA.

Questa metodologia si basa sull'utilizzo per la sintesi del DNA di deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) non marcati e di dideossinucleotidi trifosfato (ddNTPs) marcati con fluorocromi differenti. I ddNTPs a differenza dei dNTPs sono privi del gruppo ossidrilico in posizione 3' del deossiribosio necessario per la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Pertanto, l'incorporazione da parte della DNA polimerasi di un ddNTPs provoca l'interruzione della sintesi del nuovo filamento determinando la formazione di una serie di frammenti di lunghezza diversa in base al punto in cui i nucleotidi modificati sono stati incorporati. I frammenti sintetizzati sono quindi separati per elettroforesi capillare in base alla loro lunghezza e la fluorescenza relativa ad ogni ddNTPs è identificata e quantificata da un rivelatore di fluorescenza. Le emissioni fluorescenti vengono quindi integrate e trasformate in picchi di diverso colore con aree proporzionali all'intensità di emissione e rappresentate sotto forma di **ELETTROFEROGRAMMA** da cui può essere dedotta la sequenza nucleotidica del DNA analizzato (**Figura 4**).

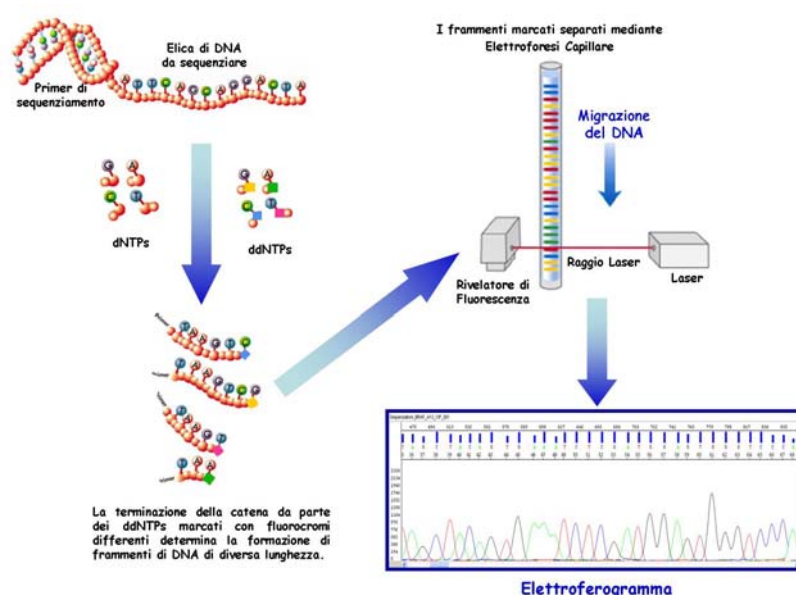


Figura 4. Sequenziamento genomico diretto con il metodo di terminazione della catena di Sanger basato sull'utilizzo di dNTPs non marcati e ddNTPs marcati con fluorocromi differenti.

Per eseguire il sequenziamento genomico diretto, i prodotti di PCR sono stati purificati mediante il QIAquick PCR *purification kit* (Qiagen), che prevede l'utilizzo di colonnine dotate di specifiche membrane di silice che permettono la purificazione di frammenti di DNA di dimensioni >100 bp.

I prodotti di PCR sono stati risospesi in un volume di un *Buffer* PB pari a 5 volte il volume di PCR, che garantisce le elevate concentrazioni saline e un pH ≥ 7.5 necessari per il legame del DNA alla membrana di silice delle colonnine QIAquick *spin* e l'eliminazione di contaminanti quali primers, nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi. I sali sono stati rimossi in modo efficiente da un successivo lavaggio con un *Buffer* PE a base alcolica e da uno *step* aggiuntivo di centrifugazione a 13.000 rpm per un minuto, che permette di eliminare ogni residuo di *Buffer* PE che potrebbe interferire con le successive reazioni enzimatiche. I prodotti purificati di PCR sono stati infine eluiti in un volume variabile di 50-250 μ l di *Buffer* EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) a seconda della resa quantitativa della reazione di PCR.

La reazione di sequenziamento è stata effettuata mediante l'ABI BigDye[®] *Terminator version 3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) in un volume finale di 20 μ l, contenente 2 μ l di prodotto di PCR purificato, 2 μ l di 5X BigDye *sequencing Buffer*, 2 μ l BigDye[®] *Terminator*, 3.2 μ l di 1 μ M primer *forward* o *reverse* in ddH₂O secondo il ciclo riportato in **Tabella VII**.

<i>Step</i>	N° Cicli	Fase	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	1		96°C	1 minuto
Sintesi	25	Denaturazione	96°C	10 secondi
		<i>Annealing</i>	50°C	5 secondi
		Estensione	60°C	4 minuti
<i>Store</i>	1		4°C	∞

Tabella VII. Protocollo utilizzato per la reazione di sequenziamento.

I prodotti della reazione di sequenziamento sono stati purificati mediante un processo di precipitazione etanolica che prevede una prima fase di incubazione della reazione di sequenza per 20 minuti in ghiaccio in presenza di 5 μ l di una soluzione di Ammonio Acetato 7.5 M a pH 7.4, 5 μ l di una soluzione 10 mg/ml w/v di glicogeno e 60 μ l di etanolo assoluto ghiacciato, seguita da una centrifugazione a 13.000 rpm per 20 minuti,

al termine della quale il supernatante è stato aspirato ed il *pellet* formatosi è stato lavato con 200 µl di etanolo ghiacciato al 70% per 5 minuti a 13.000 rpm.

Dopo aver aspirato il supernatante, i *pellet* sono stati fatti asciugare all'aria per eliminare le tracce residue di etanolo, risospesi in 8 µl di ddH₂O, caricati nelle piastre di sequenziamento in rapporto 1:1 con HiDi Formammide (Applied Biosystems) e denaturati a 95°C per 2 minuti.

L'elettroforesi capillare è stata effettuata utilizzando l'analizzatore automatico ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) ed i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il *software Sequencing Analysis 5.2* (Applied Biosystems).

3.3 Analisi mutazionale del gene *K-Ras*

L'analisi mutazionale dei codoni 12 e 13 del gene *K-Ras* (Sequenza di riferimento ENSG00000133703) è stata effettuata mediante pirosequenziamento, una tecnica di sequenziamento genomico mediante sintesi sviluppata nel 1998 da Mostafa Ronaghi [103], che rappresenta ad oggi un sistema di sequenziamento unico per rapidità, specificità, sensibilità e la possibilità di fornire risultati quantitativi.

Il pirosequenziamento è una tecnica di sequenziamento genomico basata sul monitoraggio in tempo reale della sintesi del DNA attraverso il rilevamento dei segnali di bioluminescenza prodotti in seguito all'incorporazione di un nucleotide. L'intensità del segnale luminoso è direttamente proporzionale al numero di basi introdotte dalla polimerasi nel filamento di DNA di nuova sintesi che si forma per estensione del primer di sequenziamento.

L'analisi mutazionale è stata effettuata utilizzando il kit CE-IVD Anti-EGFR MoAb *response*[®] (*K-Ras status*) (Diatech Pharmagenetics) avvalendosi del sistema PyroMark Q96 ID *system* che permette l'identificazione delle mutazioni più frequenti del gene *K-Ras* (p.G12D, p.G12V, p.G12A, p.G12S, p.G12R, p.G12C, p.G13D e p.G13C).

3.3.1 Amplificazione dei codoni 12 e 13 del gene *K-Ras*

Le reazioni di amplificazione dei codoni 12 e 13 del gene *K-Ras* sono state effettuate mediante *Real-time* PCR in un volume finale di 50 µl, contenente 100 ng di DNA genomico come template, 10 µl di 5X R-PCR *Buffer*, 1.5 µl di 50 mM MgCl₂, 1 µl di

10 mM dNTPs, 1 µl di una miscela dei *primers forward* e *reverse*, 2.5 µl di 20X EvaGreenTM Dye, un agente intercalante di seconda generazione, 0.3 µl di TaKaRa Ex TaqTM HS 5 U/µl (Takara Inc) e acqua *DNase-free* a volume. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando lo strumento *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research) secondo il protocollo di amplificazione riportato nella **Tabella VIII** selezionando il *gain* 8 per l'acquisizione del segnale nel canale *Green*.

<i>Step</i>	N° Cicli	Fase	Temperatura	Tempo
Attivazione Taq Polimerasi	1		95°C	1 minuto
Amplificazione	35	Denaturazione	95°C	20 secondi
		<i>Annealing</i>	57°C	30 secondi
		Estensione	72°C	30 secondi
Estensione Finale	1		60°C	5 minuti
Acquisizione canale <i>Green</i>	5		60°C	5 secondi

Tabella VIII. Ciclo di PCR utilizzato per amplificare i codoni 12 e 13 del gene *K-Ras*.

I risultati dell'amplificazione sono stati analizzati con un'analisi *end-point* che considera i dati di fluorescenza acquisiti nel canale *Green* impostando come valori di *threshold* per la definizione dei campioni negativi il valore 25 e per la definizione dei campioni positivi il valore 75.

3.3.2 Pirosequenziamento

Nel pirosequenziamento il template per la reazione di sequenziamento è costituito da un prodotto di PCR specifico per la sequenza che si vuole analizzare ottenuto utilizzando dei primers biotinilati.

I prodotti di PCR sono stati purificati con una strategia di purificazione in fase solida su piastra che si basa sull'uso di biglie di sefarosio rivestite da molecole di streptavidina, che grazie alla sua elevata affinità per la biotina permette di immobilizzare i prodotti di PCR biotinilati ed eliminare le altre componenti della reazione di PCR. Per effettuare tale purificazione, 20 µl del prodotto di PCR sono stati combinati con 60 µl di una *Binding mix* costituita da 37 µl di *SEQ Binding Buffer*, 3 µl

di biglie di sefarosio (*Streptavidin SephasoreTM High performance*, GE Healthcare) e 20 µl di *MB water*, e posti in agitazione a 1.400 rpm per 15 minuti.

La purificazione in fase solida dei templati per la reazione di pirosequenziamento si avvale dell'utilizzo del sistema PyroMark Q96 *Vacuum Workstation* (Qiagen) costituito da una pompa a vuoto, un *Vacuum Prep Tool* che permette di immobilizzare le biglie di sefarosio sulla punta dei filtri che lo costituiscono una volta applicato il vuoto e una *Vacuum Prep Worktable* che permette la rimozione delle componenti della reazione di PCR e la denaturazione dei prodotti di PCR purificati. I templati di PCR biotinilati a singola elica sono stati quindi ibridati per 2 minuti su un blocco termostato a 80°C con il *primer* di sequenziamento nella piastra di pirosequenziamento.

La reazione di pirosequenziamento prevede cinque fasi principali che vedono l'intervento successivo di quattro enzimi, rappresentati da:

- **FRAMMENTO DI KLENOW DELLA DNA POLIMERASI I**, che catalizza l'incorporazione di un dNTPs all'interno del filamento di DNA se esso è complementare alla base del filamento stampo. Ogni evento di incorporazione è accompagnato dal rilascio di una molecola di pirofosfato inorganico (PPi) in quantità equimolare a quella del nucleotide incorporato.
- **ATP SOLFORILASI**, che in presenza di adenosina-5'-fosfosolfato converte in modo stechiometrico l'ADP in ATP utilizzando il PPi rilasciato dal frammento di Klenow della DNA polimerasi I.
- **LUCIFERASI**, che utilizza l'ATP prodotta dall'ATP solforilasi per convertire la D-luciferina in ossiluciferina con conseguente produzione di un segnale luminoso di intensità proporzionale alla quantità di ATP prodotta nelle reazioni precedenti.
- **APIRASI**, che degrada continuamente tutti i dNTPs che non vengono incorporati nel filamento nascente di DNA prima della dispensazione del nucleotide successivo, permettendo in questo modo di stabilire che il segnale di luce rilevato quando viene aggiunto un determinato nucleotide deriva esclusivamente dall'incorporazione di quello specifico nucleotide e non dai nucleotidi introdotti nei cicli precedenti o dall'ATP prodotta dall'ATP solforilasi (**Figura 5**).

Il segnale luminoso generato dalla luciferasi in seguito all'incorporazione dei diversi deossinucleotidi trifosfato che vengono aggiunti ciclicamente uno alla volta secondo un ordine di dispensazione ben preciso, viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile

ad accoppiamento di carica e registrato in un **PIROGRAMMA**. La presenza del segnale luminoso indica la presenza del nucleotide nella posizione specifica della catena, mentre l'intensità del segnale è proporzionale al numero di ripetizioni della base lungo lo stesso filamento (**Figura 5**).

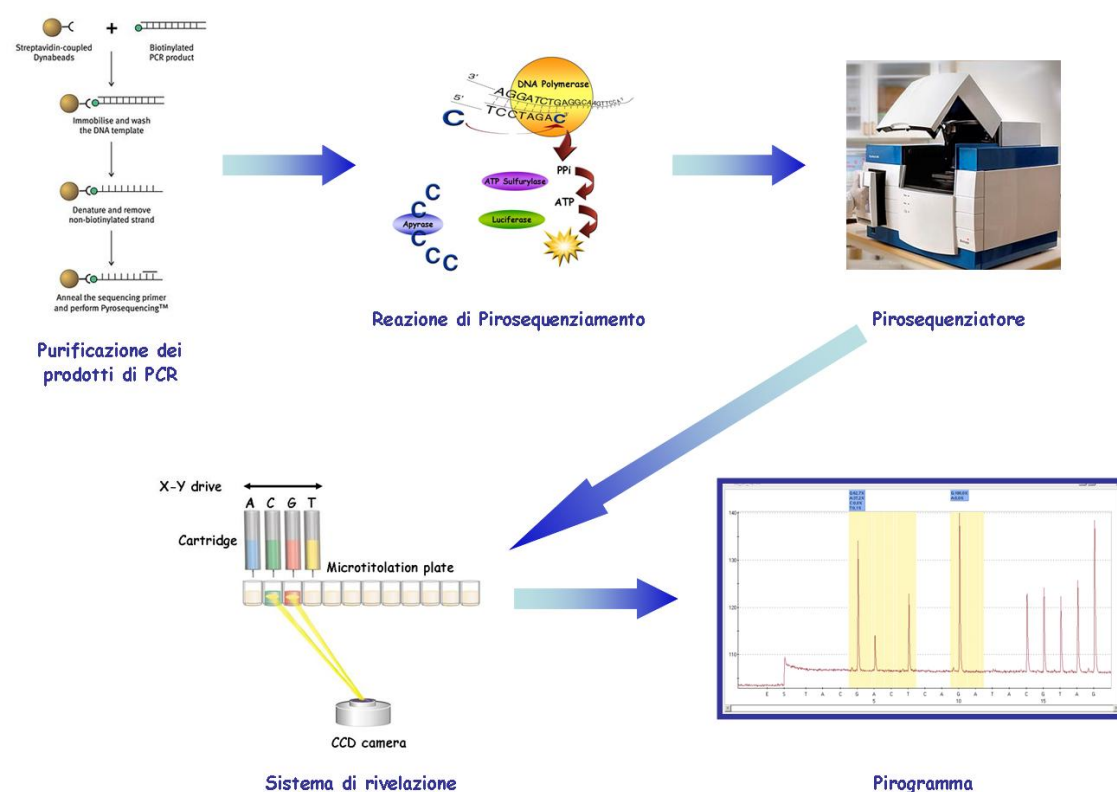


Figura 5. Metodica di pirosequenziamento.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il *software* PyroMark ID che permette l'analisi genetica qualitativa e quantitativa. In base alla frequenza dell'allele mutato i campioni vengono identificati come *wild type*, mutati o indeterminati a seconda che tale frequenza sia rispettivamente <7%, > 10% o compreso nell'intervallo 7-10%.

I campioni che presentavano pirogrammi alterati non riconducibili alle mutazioni analizzate dall'Anti-EGFR MoAb *Response*[®] (*K-Ras status*) (Diatech Pharmagenetics) sono stati ulteriormente analizzati mediante sequenziamento genomico diretto utilizzando lo stesso protocollo utilizzato per la genotipizzazione del gene *EGFR* ad eccezione della reazione di amplificazione di seguito riportata.

3.3.3 Amplificazione del gene *K-Ras* mediante PCR

L'esone 2 del gene *K-Ras* è stato amplificato mediante PCR utilizzando una coppia di *primers* specifica (*primer forward* 5'-TCATTATTTTATTATAAGGCC-3'; *primer reverse* 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3') disegnata mediante il *software* Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), che genera un amplicone di 186 bp.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25 µl, contenente 100 ng di DNA genomico come template, 2.5 µl di 10X PCR *Buffer*, 2 µl di 25 mM MgCl₂, 2 µl di 10 mM dNTPs, 0.5 µl di una soluzione 20 µM di ciascun *primer*, 0.2 µl di FastStart Taq DNA Polimerasi 5 U/µl (Roche Diagnostics) e acqua *DNase-free* a volume, utilizzando termocicizzatore T3000 *Thermocycler* 48 (Biometra) secondo il protocollo di amplificazione riportato nella **Tabella IX**.

<i>Step</i>	N° Cicli	Fase	Temperatura	Tempo
Attivazione Taq Polimerasi	1		95°C	4 minuti
Amplificazione	40	Denaturazione	95°C	30 secondi
		<i>Annealing</i>	55°C	45 secondi
		Estensione	72°C	1 minuto
Estensione Finale	1		72°C	10 minuti

Tabella IX. Ciclo di PCR utilizzato per amplificare l'esone 2 del gene *K-Ras*.

4. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il *software* MedCalc versione 9.2 utilizzando un'analisi di varianza semplice (*one-way* ANOVA) e il test del Chi-quadro (χ^2) per verificare la presenza di associazione tra i differenti parametri biologici analizzati.

L'analisi di sopravvivenza è stata eseguita utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e il Log-rank test è stato utilizzato per comparare le curve di sopravvivenza.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per *P-value* minori di 0.05.

RISULTATI

1. Profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21* nei NSCLC

L'espressione delle forme mature dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* è stata valutata in una serie di 80 pazienti affetti da NSCLC e in 27 campioni di tessuto polmonare normale al fine di evidenziare eventuali modificazioni dei loro profili di espressione.

L'espressione di *Let-7g* e *miR-21* è stata valutata in triplicato mediante *Real-time* PCR in ciascun campione di tessuto normale e di tessuto tumorale e normalizzata rispetto ai valori di un controllo endogeno di espressione rappresentato dal microRNA *RNU6B*. Dopo la normalizzazione, è stata eseguita un'analisi di *clustering* gerarchico non supervisionato utilizzando la distanza euclidea come misura di similarità e l'algoritmo basato sulla distanza media per classificare i 109 campioni analizzati in questo studio. Tale procedura di analisi, effettuata senza utilizzare alcuna informazione sull'identità dei campioni analizzati, ha portato alla loro classificazione in due *clusters* principali, basati sulla similarità dell'espressione di *miR-21*: un *cluster* a bassa espressione di *miR-21*, corrispondente ai campioni di tessuto normale, ed un *cluster* ad alta espressione di tale microRNA corrispondente ai campioni di NSCLC (**Figura 1**).

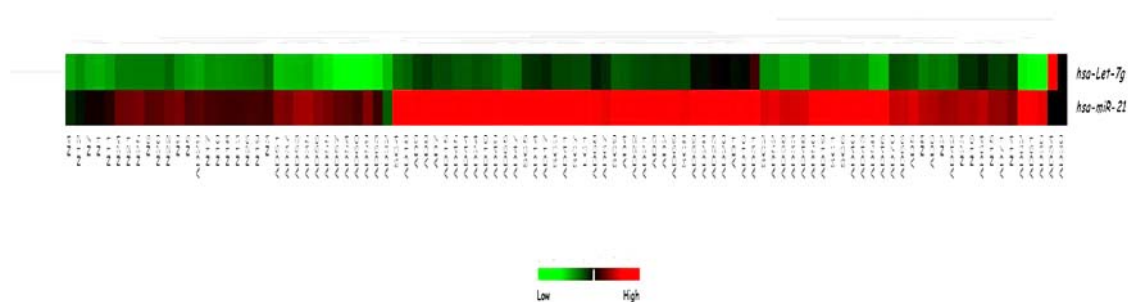


Figura 1. Dendrogramma del *clustering* gerarchico non supervisionato dei microRNA *Let-7g* e *miR-21*. L'intensità di espressione dei microRNA riportati sulla destra è visualizzata secondo la scala di colore riportata in basso, dove il colore rosso rappresenta un'up-regolazione e il verde una down-regolazione.

Come è mostrato in **Figura 2**, il confronto tra l'espressione relativa di *Let-7g* rispetto al controllo endogeno di espressione *RNU6B* nei campioni di tessuto polmonare normale ed nei campioni di NSCLC ha evidenziato una down-regolazione di *Let-7g* senza evidenziare delle differenze statisticamente significative nell'espressione di questo microRNA tra i due tipi di tessuto (-0.897 ± 0.148 vs -0.709 ± 0.168 , $p=0.585$).

Al contrario, l'espressione di *miR-21*, come messo in evidenza anche dall'analisi di *clustering* gerarchico non supervisionato, è risultata essere significativamente aumentata nei campioni di NSCLC rispetto ai campioni di tessuto polmonare normale (4.842 ± 0.163 vs 2.509 ± 0.182 , $p<0.0001$) (**Figura 2**).

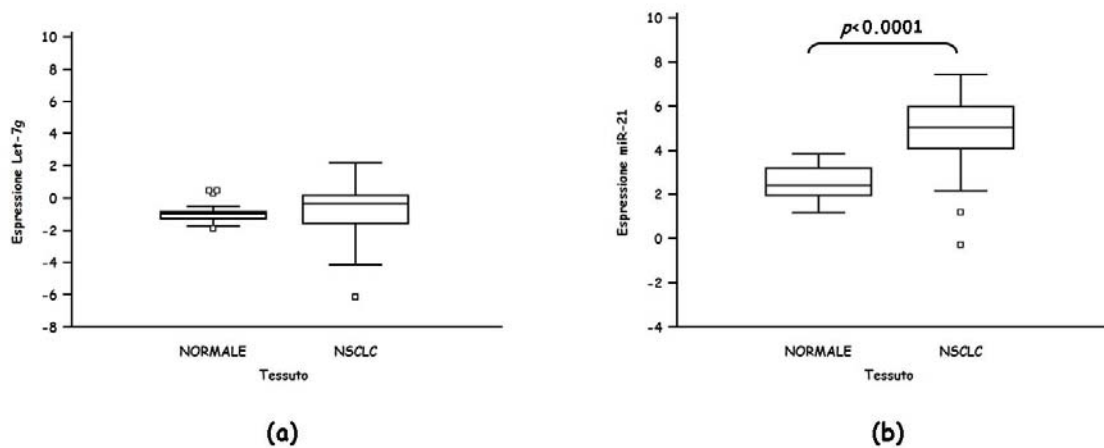


Figura 2. Grafico *Box and Whisker Plot* dell'espressione di (a) *Let-7g* e (b) *miR-21* in una serie di 80 pazienti affetti da NSCLC e in 27 tessuti polmonari normali. I valori di espressione normalizzati rispetto al controllo endogeno *RNU6B* sono mostrati come $\text{Log}_2 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2. Correlazioni dell'espressione di *Let-7g* e *miR-21* con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC

Per verificare l'eventuale presenza di una correlazione tra il profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21* nei NSCLC e le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti inseriti in questo studio, l'espressione relativa di questi due microRNA nei tessuti tumorali di NSCLC normalizzata rispetto ad un *pull* di tessuti polmonari normali è stata calcolata utilizzando il metodo di normalizzazione del $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, in quanto tale procedura di normalizzazione si è dimostrata essere più stringente rispetto al metodo della *Global Median Normalization*.

In seguito a tale analisi, i campioni tumorali provenienti dagli 80 pazienti con NSCLC sono stati classificati come ad alta (*High*) o bassa (*Low*) espressione per ciascuno dei due microRNA a seconda che il *fold change* fosse rispettivamente $>$ o \leq del valore mediano, il quale è risultato essere pari a 1.315 ± 0.175 per *Let-7g* e 6.964 ± 0.759 per *miR-21*.

L'analisi statistica non ha evidenziato la presenza di alcuna correlazione statisticamente significativa tra l'espressione relativa di *Let-7g* e *miR-21* e le principali variabili clinico-patologiche, quali l'età alla diagnosi, il sesso, l'abitudine al fumo, i diversi sottotipi istologici di NSCLC o le dimensioni del tumore (**Tabella I**).

Caratteristica clinico-patologica	Espressione <i>Let-7g</i> [§]		<i>p</i> [*]	Espressione <i>miR-21</i> [§]		<i>p</i> [*]
	<i>Low</i>	<i>High</i>		<i>Low</i>	<i>High</i>	
Età						
≤67 anni	22 (57.9%)	16 (42.1%)	0.263	19 (50%)	19 (50%)	0.823
>67 anni	18 (42.8%)	24 (57.2%)		21 (50%)	21 (50%)	
Sesso						
Maschi	28 (50.9%)	27 (49.1%)	0.809	27 (49.1%)	28 (50.9%)	0.809
Femmine	12 (48%)	13 (52%)		13 (52%)	12 (48%)	
Stato di fumatore						
<i>Never smoking</i>	7 (53.8%)	6 (46.2%)	0.425	7 (53.8%)	6 (46.2%)	0.872
<i>Former smoking</i>	17 (65.4%)	9 (34.6%)		16 (61.5%)	10 (38.5%)	
<i>Current smoking</i>	2 (100%)	0 (0%)		1 (50%)	1 (50%)	
Istologia						
ADC	27 (49.1%)	28 (50.9%)	0.157	24 (43.6%)	31 (56.4%)	0.065
SCC	13 (61.9%)	8 (38.1%)		14 (66.7%)	7 (33.3%)	
LCC	0 (0%)	2 (100%)		2 (100%)	0 (0%)	
Altri istotipi	0 (0%)	2 (100%)		0 (0%)	2 (100%)	
Dimensioni tumore						
T1 (T1a-T1b)	6 (50%)	6 (50%)	0.111	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0.793
T2 (T2a-T2b)	16 (51.6%)	15 (48.4%)		13 (41.9%)	18 (58.1%)	
T3	2 (14.3%)	12 (85.7%)		8 (57.2%)	6 (42.8%)	
T4	3 (50%)	3 (50%)		3 (50%)	3 (50%)	
Stato linfonodale						
Negativo	4 (21.1%)	15 (78.9%)	0.046	9 (47.4%)	10 (52.6%)	0.633
Positivo	20 (52.6%)	18 (47.4%)		14 (36.8%)	24 (63.2%)	

Tabella I. Correlazioni tra le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti arruolati nello studio e il profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21*. ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma a cellule squamose; LCC, carcinoma a grandi cellule. [§]I valori sono mostrati come *n* (%). ^{*}I valori *p* statisticamente significativi sono indicati in grassetto.

In particolare, per quanto riguarda l'espressione di *Let-7g* e *miR-21* nei due principali sottotipi istologici di NSCLC, l'ADC e il SCC, il nostro studio non ha evidenziato delle

differenze statisticamente significative nel *fold change* dell'espressione di *Let-7g* e *miR-21* tra i due diversi istotipi di NSCLC. Tuttavia, il rapporto di espressione è risultato essere sempre spostato a favore degli ADC con un rapporto dei *fold change* ADC/SCC pari a 1.52 per *Let-7g* e 1.25 per *miR-21*. Per quest'ultimo, in particolare, abbiamo osservato una relazione tra il *fold change* di espressione e la classificazione istologica nei diversi sottotipi di NSCLC che tende alla significatività statistica ($p=0.0651$) (**Tabella I**) con un *fold change* medio di espressione di *miR-21* pari a 9.148 ± 0.918 negli ADC e a 7.337 ± 1.541 nei SCC (**Figura 3**).

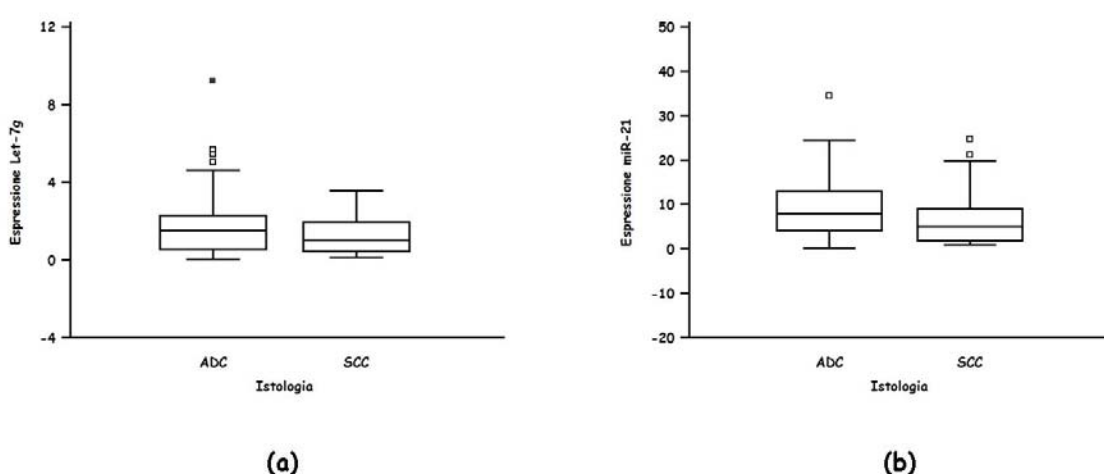


Figura 3. Grafico *Box and Whisker Plot* dell'espressione di **(a)** *Let-7g* e **(b)** *miR-21* in una serie di 80 pazienti affetti da NSCLC. I valori di espressione sono mostrati come *fold change* dell'espressione relativa dei due microRNA normalizzata rispetto al controllo endogeno di espressione *RNU6B* ed a un *pull* di tessuti normali polmonari.

L'analisi statistica ha invece evidenziato la presenza di una relazione statisticamente significativa tra l'espressione relativa di *Let-7g* e lo *status* linfonodale dei pazienti alla diagnosi ($p=0.046$). È da sottolineare che l'83.3% dei pazienti con NSCLC che mostravano dei bassi livelli dell'espressione relativa di *Let-7g* presentava linfonodi positivi alla diagnosi ($p=0.0022$), mentre non sono state riscontrate differenze sostanziali nello *status* linfonodale dei pazienti con tumori ad alta espressione di *Let-7g* (**Figura 4**).

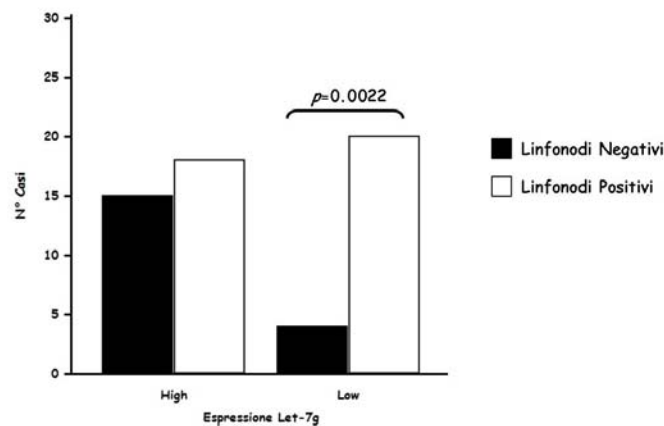


Figura 4. Relazione tra espressione di *Let-7g* e stato linfonodale dei pazienti con NSCLC.

3. Predizione dei geni *target* di *Let-7g* e *miR-21*

Dal momento che i microRNA esplicano la loro funzione biologica mediante la regolazione di specifici geni *target*, è stata effettuata un'analisi *in silico* dei geni *target* associati a *Let-7g* e *miR-21* mediante strumenti bio-informatici accessibili liberamente *on line*. In particolare, per questo studio sono stati utilizzati quattro differenti *software*, miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org>), Pictar (<http://www.pictar.org>) e miRDB (<http://mirdb.org>), mirati all'identificazione degli mRNA bersaglio sulla base della complementarità di sequenza e conservazione evolutiva del 3'UTR con la regione *seed* del microRNA d'interesse.

Tale ricerca ha prodotto una pletora di potenziali geni bersaglio per ciascuno dei microRNA analizzati, in parte non sovrapponibili a causa dei diversi criteri di analisi impiegati dai vari algoritmi. Al fine di ridurre al minimo il numero di falsi positivi e per circoscrivere la nostra analisi, sono stati considerati solamente i geni *target* generati dagli algoritmi dei diversi *software* utilizzati con gli *score* più elevati e quelli che erano stati predetti da almeno due dei quattro *software* utilizzati. In seguito a tali considerazioni, sono stati identificati 24 potenziali geni bersaglio per *Let-7g*, tra i quali quelli che hanno mostrato lo *score* più alto sono stati *HMGA2*, *N-RAS*, *ERCC6* e *MAP3K3*, e 26 geni bersaglio per *miR-21*, tra i quali quelli con lo *score* più alto sono stati *PDCD4*, *WWP1*, *MSH2*, *CCL1* e *MALT1* (Tabella II).

Una volta identificati i bersagli dei microRNA analizzati in questo studio, i geni *target* di *Let-7g* e *miR-21* sono stati classificati e raggruppati in base alla loro funzione

molecolare e al processo biologico nel quale sono coinvolti mediante il *software* di analisi *Gene Ontology* PANTHER (<http://www.pantherdb.org>).

Tra i processi biologici principalmente correlati alla patogenesi tumorale sono risultati essere influenzati dall'espressione di *Let-7g* e *miR-21* processi fondamentali quali l'apoptosi, le vie di trasduzione del segnale, la regolazione del ciclo cellulare e la riparazione del DNA (**Tabella II**).

microRNA	Locus	Pathway	Geni target
<i>Let-7g</i>	3p21.1	Ciclo cellulare	<i>HMGA2, E2F5, COIL, DNA2, CCNJ, CCND2, CDC25A, LIN28B, BACH1</i>
		Trascrizione/traduzione	<i>BZW1, HIC2</i>
		Riparazione del DNA	<i>ERCC6, SMARCAD1, BACH1</i>
		Apoptosi	<i>N-MYC, CASP3, MAP4K3</i>
		MAPK pathway	<i>N-RAS, MAP3K3, MAP4K3, MAPK6</i>
		Insulina/TGFβ pathway	<i>FOXP2, IGF1R, IGF2BP2</i>
		PI3K pathway	<i>N-RAS, FOXP2, CCND2</i>
		Wnt pathway	<i>END1, END2, N-MYC</i>
<i>miR-21</i>	17q23.2	Ciclo cellulare	<i>STAG2, KIF6</i>
		Riparazione del DNA	<i>MSH2, FANCC, CHD7</i>
		Apoptosi	<i>PDCD4, APAF1, STAT3, MALT1, SGK3</i>
		Angiogenesi	<i>SOS2, JAG1, MAP3K1, STAT3</i>
		Proteolisi	<i>WWP1</i>
		Adesione cellulare	<i>CCL1, MATN2, TGFBI, VCL</i>
		MAPK pathway	<i>MAP3K1, STAT3, SOS2, NKIRAS1, SPRY1, SPRY2.</i>
		TGFβ pathway	<i>BMP2, SMAD7</i>
		Proteine G pathway	<i>SOS2, TIAM2, GPR64, KRIT1</i>

Tabella II. Predizione dei geni *target* dei microRNA *Let-7g* e *miR-21*.

4. Analisi genetica

L'analisi mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* è stata effettuata in 78 degli 80 pazienti arruolati in questo studio, in quanto per due pazienti è stato possibile utilizzare un unico preparato citologico, rappresentato da un *brushing* bronchiale, il quale è stato impiegato per effettuare l'estrazione dell'RNA e la valutazione dei profili di espressione di *Let-7g* e *miR-21*. Per i due pazienti per i quali avevamo a disposizione sia il preparato citologico pre-operatorio, rappresentato da un FNA, che il preparato istologico post-

operatorio, l'analisi mutazionale è stata condotta su entrambi i tipi di preparato ed i risultati ottenuti hanno dimostrato una concordanza assoluta nello *status* mutazionale dei due geni analizzati indipendentemente dal tipo di materiale utilizzato per l'analisi.

4.1 Analisi mutazionale del gene *EGFR*

Lo screening mutazionale di primo livello effettuato mediante SSCP degli esoni 18, 19, 20 e 21 del gene *EGFR* codificanti per il dominio tirosin-chinasico del recettore ha dimostrato la presenza di un profilo di mobilità elettroforetica differente da quello di un campione di riferimento *wild type* in 23 dei 78 pazienti arruolati nello studio.

Nel dettaglio, nessuno dei pazienti analizzati ha mostrato alterazioni del *pattern* di migrazione elettroforetica del prodotto di PCR relativo all'esone 18 del gene *EGFR*. Al contrario, in 16, 3, e 5 dei 78 pazienti soggetti a *screening* mutazionale sono stati osservati profili di mobilità elettroforetica dei prodotti di PCR relativi rispettivamente agli esoni 19, 20 e 21 del gene *EGFR* differenti da quelli del campione di riferimento *wild type*. In uno di questi pazienti, le alterazioni del *pattern* di migrazione elettroforetica erano presenti contemporaneamente sia a livello dell'esone 19 che a livello dell'esone 20 del gene *EGFR* (**Figura 5**).

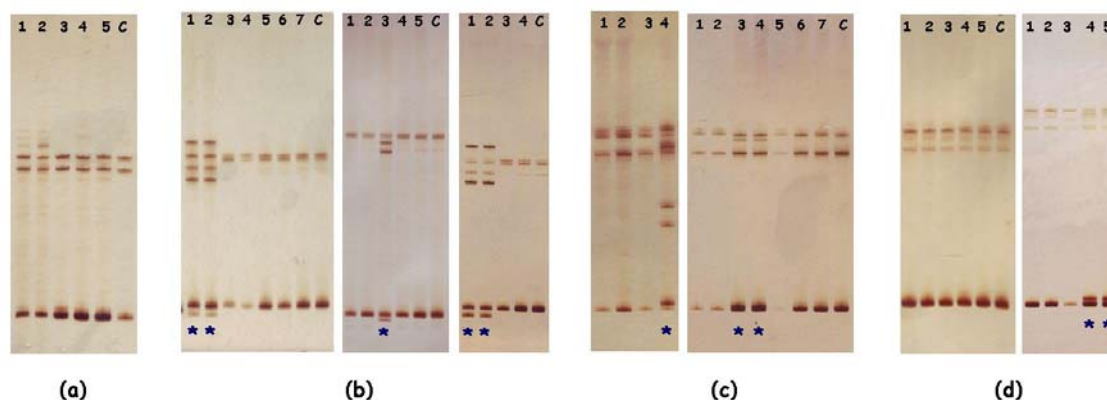


Figura 5. Esempi rappresentativi dell'SSCP dei prodotti di PCR relativi agli esoni (a)18, (b) 19, (c) 20 e (d) 21 del gene *EGFR*. I campioni con un *pattern* di mobilità elettroforetica alterato rispetto ad un campione di riferimento *wild type* (C) sono indicati con un asterisco (*).

I campioni con un profilo di migrazione differente da quello del campione di riferimento *wild type* sono stati caratterizzati mediante sequenziamento genomico

diretto al fine di rivelare la presenza di eventuali mutazioni. L'analisi genetica mediante sequenziamento genomico diretto è stata inoltre condotta in 10 dei 55 campioni che non presentavano alterazioni del pattern di mobilità elettroforetica, in modo da ottenere una validazione interna della metodica. Tale analisi non ha rivelato alcuna alterazione della sequenza nucleotidica degli esoni del gene *EGFR* analizzati, confermando in tal modo i risultati ottenuti nello *screening* preliminare mediante SSCP.

L'analisi mutazionale ha rivelato la presenza di mutazioni del gene *EGFR* in 23/78 (29.5%) pazienti affetti da NSCLC, confermando che le alterazioni del *pattern* di migrazione elettroforetica osservate mediante SSCP corrispondevano effettivamente ad alterazioni della sequenza nucleotidica dei rispettivi esoni del gene *EGFR*.

L'analisi mutazionale ha permesso di identificare e caratterizzare la presenza di 16 mutazioni nell'esone 19, di 3 mutazioni nell'esone 20 e di 5 mutazioni nell'esone 21 del gene *EGFR* (Tabella III, Figura 6).

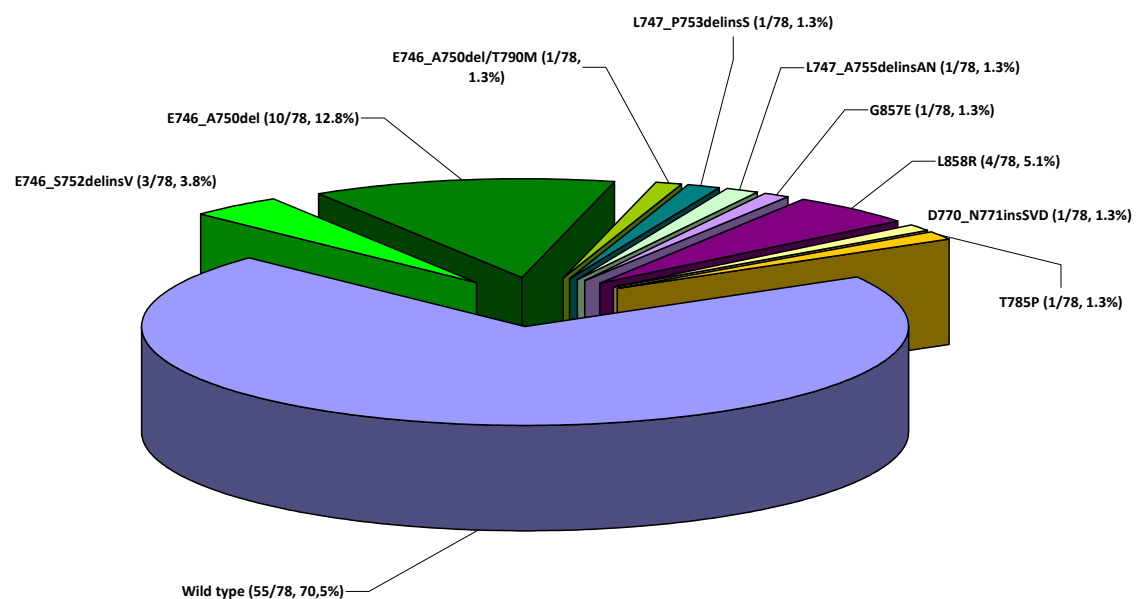


Figura 6. Distribuzione e frequenza delle diverse mutazioni del gene *EGFR* identificate in una serie di 78 pazienti con NSCLC.

In particolare, tutte le mutazioni osservate nell'esone 19 sono risultate essere delezioni *in frame* del motivo ELREA o mutazioni complesse in cui la delezione del motivo ELREA è accompagnata da un'inserzione. La mutazione dell'esone 19 più frequente è risultata essere la delezione p.E746_A750del (11/16, 68.8%), seguita dalle

mutazioni complesse p.E746_A750delinsV (3/16, 18.8%), p.L747_A755delinsAN (1/16, 6.2%) e p.L747_P753delinsS (1/16, 6.2%) (**Tabella III, Figure 6-7**).

Esone	ID Paziente	Sostituzione Nucleotidica	Sostituzione Amminoacidica	Tipo di mutazione
19	AD20	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD23	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD24	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD26	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD32	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD39	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD27	c.2235_2249del	p.E746_A750	Delezione
19	AD28*	c.2236_2250del	p.E746_A750	Delezione
19	AD29*	c.2236_2250del	p.E746_A750	Delezione
19	AD35	c.2236_2250del	p.E746_A750	Delezione
19	AD40	c.2236_2250del	p.E746_A750	Delezione
19	AD16	c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	Delezione/ Inserzione
19	AD21	c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	Delezione/ Inserzione
19	AD37	c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	Delezione/ Inserzione
19	AD22	c.2239_2264delinsGCCAA	p.L747_A755delinsAN	Delezione/ Inserzione
19	AD25	c.2240_2257del	p.L747_P753delinsS	Delezione/ Inserzione
20	AD41	c.2311_2312insGCGTGGACA	p.D770_N771insSVD	Inserzione
20	AD36	c.2353A>C	p.T785P	Missenso
20	AD27	c.2369C>T	p.T790M	Missenso
21	AD7	c.2570G>A	p.G857E	Missenso
21	AD31	c.2573T>G	p.L858R	Missenso
21	AD33	c.2573T>G	p.L858R	Missenso
21	AD38	c.2573T>G	p.L858R	Missenso
21	AD42	c.2573T>G	p.L858R	Missenso

Tabella III. Mutazioni del gene *EGFR* osservate in una serie di 78 pazienti affetti da NSCLC.
*Analisi mutazionale condotta sia sul preparato citologico che in quello istologico.

Per quanto riguarda invece le mutazioni dell'esone 20 del gene *EGFR*, l'analisi mutazionale ha rivelato la presenza di due mutazioni missenso (p.T785P e p.T790M) e di un'inserzione *in frame* di tre amminoacidi (serina, valina e acido aspartico) tra il

codone 770 e il codone 771 del gene *EGFR* codificanti rispettivamente per un residuo di acido aspartico e per un residuo di asparagina (p.D770_N771insSVD). A differenza delle altre mutazioni descritte in questo studio, le mutazioni p.D770_N771insSVD e p.T790M, presente quest'ultima in un paziente che presentava anche la delezione del motivo ELREA dell'esone 19, conferiscono rispettivamente resistenza primaria e secondaria al trattamento con i TKI. Nell'esone 21 del gene *EGFR*, infine, sono state riscontrate esclusivamente due tipi di mutazioni missenso: p.L858R (4/5, 80%) e p.G857E (1/5, 20%) (**Tabella III, Figura 6-7**).

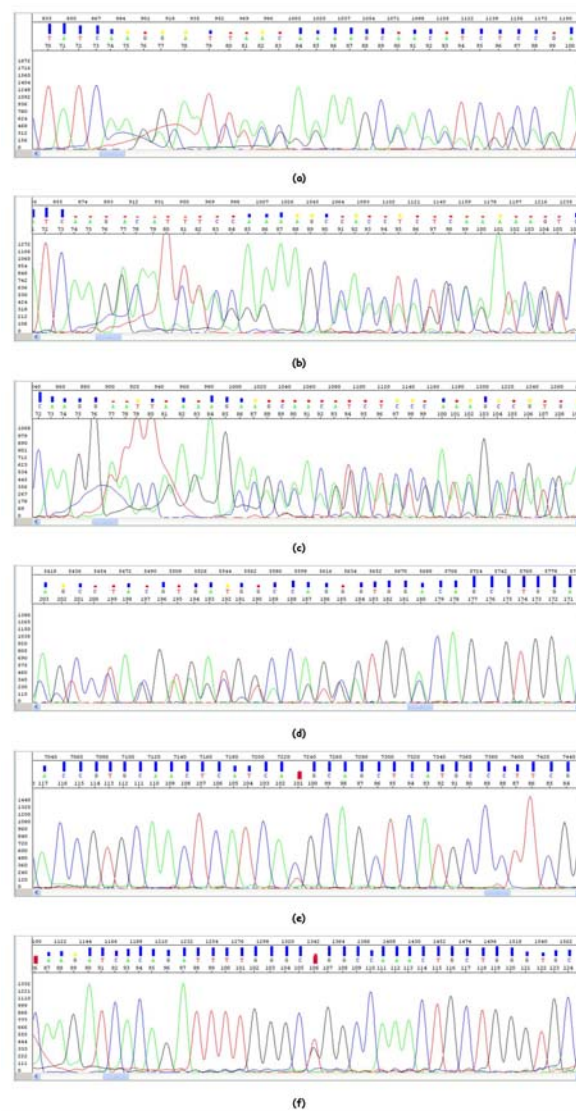


Figura 7. Elettroferogrammi relativi alle mutazioni **(a)** c.2235_2249del (p.E746_A750del), **(b)** c.2236_2250del (p.E746_A750del), **(c)** c.2237_2255delinsT (p.E746_S752delinsV), **(d)** c.2311_2312insGCGTGGACA (p.D770_N771insSVD), **(e)** c.2369C>T (p.T790M) e **(f)** c.2573T>G (p.L858R) del gene *EGFR*.

Tutte le mutazioni del gene *EGFR* identificate in questo studio sono presenti in eterozigosi e sono state precedentemente descritte nel *Catalogue of somatic mutations in cancer* (<http://www.sanger.ac.uk>).

4.2 Analisi mutazionale del gene *K-Ras*

L'analisi mutazionale mediante pirosequenziamento e sequenziamento genomico diretto ha messo in evidenza la presenza di mutazioni del gene *K-Ras* in 16 dei 78 (20.5%) pazienti con NSCLC analizzati. Tutte le mutazioni riscontrate in questo studio sono state mutazioni missenso, di cui 15/16 (93.8%) localizzate a livello del codone 12 e 1/16 (6.2%) a livello del codone 13 del gene *K-Ras* (Tabella IV, Figura 8).

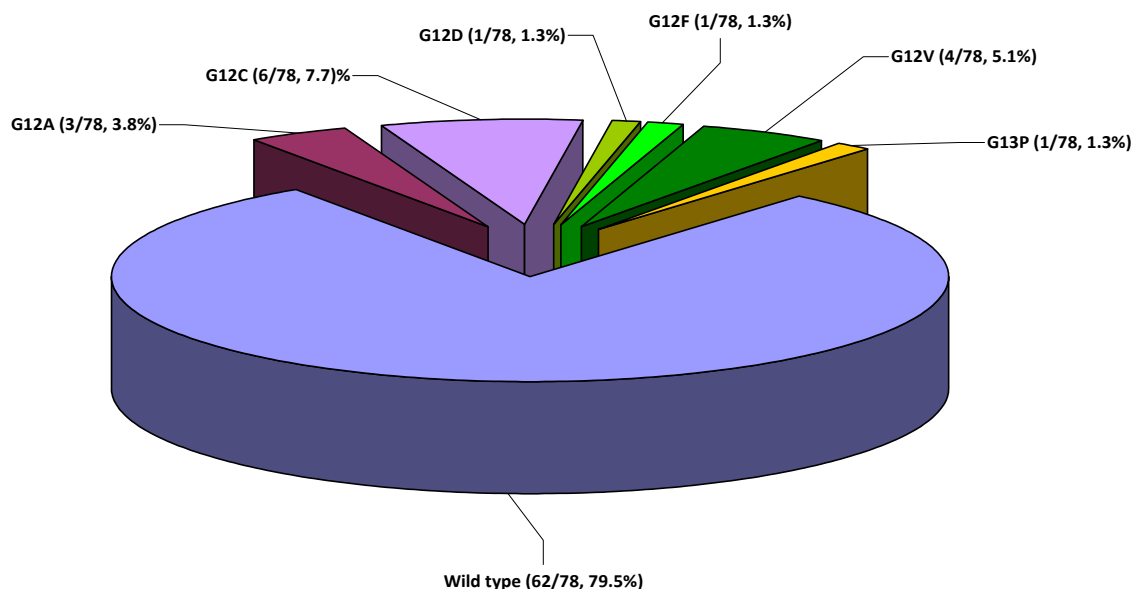


Figura 8. Distribuzione e frequenza delle diverse mutazioni del gene *K-Ras* identificate nella serie di 78 pazienti con NSCLC analizzati in questo studio.

L'analisi mutazionale effettuata mediante pirosequenziamento ha permesso l'identificazione delle seguenti sostituzioni amminoacidi del gene *K-Ras*: p.G12C (6/16, 37.5%), p.G12V (4/16, 25%), p.G12A (3/16, 18.9%) e p.G12D (1/16, 6.2%) (Tabella IV, Figura 9).

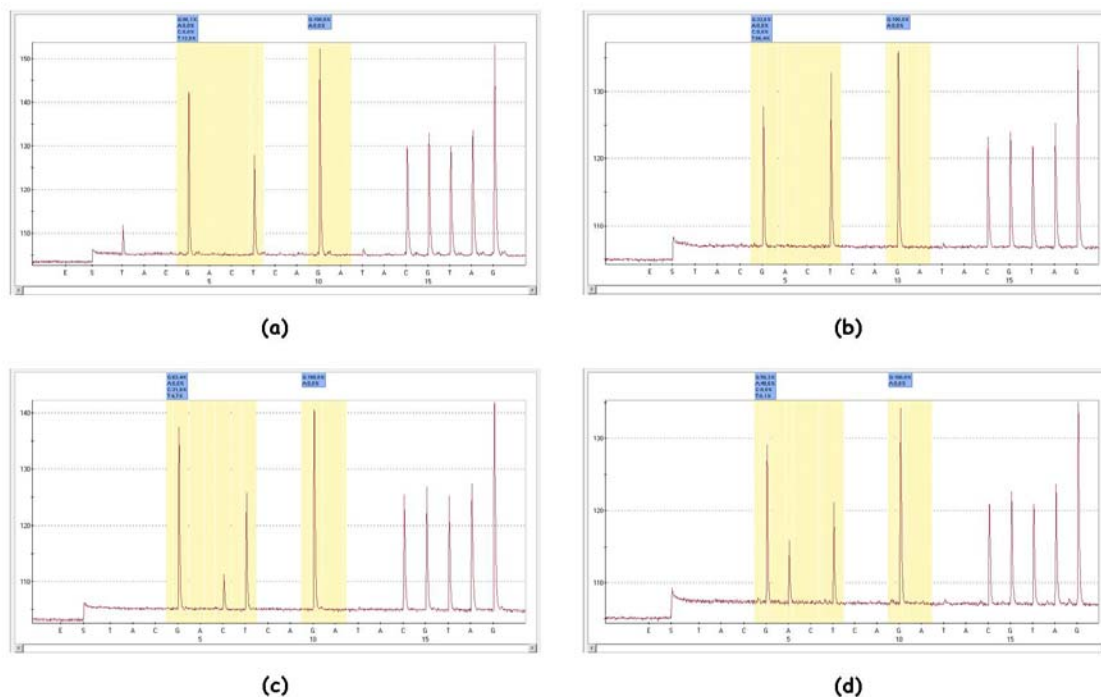


Figura 9. Pirogrammi relativi alle mutazioni **(a)** c.34G>T (p.G12C), **(b)** c.35G>T (p.G12V), **(c)** c.35G>C (p.G12A) e **(d)** c.35G>A (p.G12D) del gene *K-Ras*.

Tuttavia, l'analisi dei pirogrammi relativi a due pazienti ha messo in evidenza la presenza di una mutazione rispettivamente a livello del codone 12 e del codone 13 del gene *K-Ras*, ma non ne ha permesso l'identificazione, in quanto non rientrava nel pannello di mutazioni analizzate del *kit* Anti-EGFR MoAb *response*[®] (*K-Ras status*) (Diatech Pharmagenomics) utilizzato in questo studio (**Tabella IV, Figura 10**).

Per caratterizzare queste mutazioni, i due campioni sono stati ulteriormente analizzati mediante sequenziamento genomico diretto. L'analisi mutazionale ha quindi rivelato la presenza in entrambi i casi di una doppia sostituzione nucleotidica a livello dei nucleotidi 34 e 35 (c.34_35GG>TT) e 37 e 38 (c.37_38GG>CC) del gene *K-Ras*, che determinano rispettivamente la sostituzione della glicina in posizione 12 con un residuo di Fenilalanina (p.G12F) e della glicina in posizione 13 con un residuo di prolina (p.G13P) (**Tabella IV, Figura 10**).

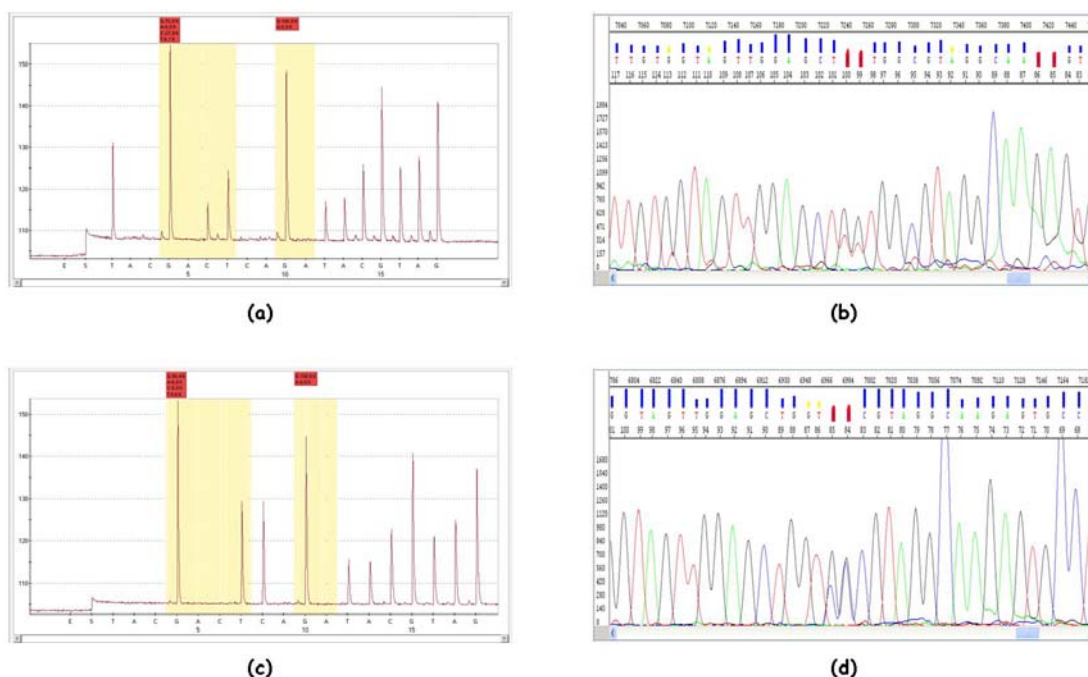


Figura 10. Pirogrammi ed elettroferogrammi relativi alle mutazioni **(a, b)** c.34_35GG>TT (p.G12F) e **(c, d)** c.37_38GG>CC (p.G13P) del gene *K-Ras*.

Codone	ID Paziente	Sostituzione Nucleotidica	Sostituzione Amminoacidica	Tipo di mutazione
12	AD9	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD10	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD15	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD17	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD18	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD44	c.34G>T	p.G12C	Missenso
12	AD65	c.34_35GG>TT	p.G12F	Missenso
12	LC1	c.35G>T	p.G12V	Missenso
12	AD19	c.35G>T	p.G12V	Missenso
12	AD45	c.35G>T	p.G12V	Missenso
12	AD46	c.35G>T	p.G12V	Missenso
12	AD1	c.35G>C	p.G12A	Missenso
12	AD14	c.35G>C	p.G12A	Missenso
12	AD62	c.35G>C	p.G12A	Missenso
12	AD61	c.35G>A	p.G12D	Missenso
13	AD43	c.37_38GG>CC	p.G13P	Missenso

Tabella IV. Mutazioni del gene *K-Ras* osservate in una serie di 78 pazienti affetti da NSCLC.

Tutte le mutazioni del gene *K-Ras* identificate in questo studio sono presenti in eterozigosi e sono state precedentemente descritte nel *Catalogue of somatic mutations in cancer* (<http://www.sanger.ac.uk>), ad eccezione della mutazione p.G13P.

Per predire il possibile effetto della mutazione p.G13P sulla funzionalità della proteina, è stata condotta un'analisi *in silico* con il programma PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu>) ed è stato valutato se tale sostituzione amminoacidica sia presente in residui amminoacidici evolutivamente conservati tra proteine appartenenti a specie differenti. Da tale analisi è emerso che la mutazione p.G13P è potenzialmente dannosa con un'elevata probabilità (score 1.000) di avere un effetto deleterio sulla conformazione e sulla funzione della proteina nativa (sensibilità 0.0, specificità 1.0) e che interessa un residuo amminoacido molto conservato tra differenti specie animali:

<i>Homo sapiens</i>	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI-----
<i>Macaca mulatta</i>	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI-----
<i>Mus musculus</i>	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI-----
<i>Canis familiaris</i>	EYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI-----
<i>Danio rerio</i>	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI-----
<i>Bos taurus</i>	MAALGGDGRLLSVSRPERQPESAALGGPGPGL

4.3 Correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e le variabili clinico-patologiche

Le mutazioni del gene *EGFR* e del gene *K-Ras* sono risultate essere mutualmente esclusive: nessuno dei casi mutati per il gene *EGFR* è risultato essere mutato per il gene *K-Ras* (**Tabella V**).

Lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* è stato quindi comparato con le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da NSCLC arruolati nel nostro studio. Nessuna relazione statisticamente significativa è stata osservata tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e l'età dei pazienti alla diagnosi, le dimensioni del tumore o lo stato dei linfonodi regionali (**Tabella V**). Tuttavia, l'analisi statistica ha dimostrato un'associazione statisticamente significativa tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e il sesso dei pazienti, oltre che con il sottotipo istologico di NSCLC.

Le mutazioni del gene *EGFR* si sono dimostrate essere più frequenti nei pazienti di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile (69.6% vs 30.4%, $p < 0.0001$), mentre

le mutazioni del gene *K-Ras* sono state osservate più frequentemente nei pazienti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile (93.8% vs 6.2%, $p=0.0376$) (**Tabella V**).

Caratteristica clinico-patologica	Status <i>EGFR</i> [§]		<i>P</i> [*]	Status <i>K-Ras</i> [§]		<i>P</i> [*]
	Wild type	Mutato		Wild type	Mutato	
Status <i>EGFR</i>						
Wild type				39 (70.9%)	16 (29.1%)	0.0095
Mutato				23 (100%)	0 (0%)	
Età						
<67 anni	24 (43.6%)	12 (52.2%)	0.6595	25 (40.3%)	11 (68.8%)	0.0797
≥67 anni	31 (56.4%)	11 (47.8%)		37 (59.7%)	5 (31.2%)	
Sesso						
Maschi	47 (85.5%)	7 (30.4%)	<0.0001	39 (62.9%)	15 (93.8%)	0.0376
Femmine	8 (14.5%)	16 (69.6%)		23 (37.1%)	1 (6.2%)	
Istologia						
ADC	32 (58.2%)	22 (95.7%)	0.0049	39 (62.9%)	15 (93.8%)	0.0369
SCC	20 (36.4%)	0 (0%)		20 (32.3%)	0 (0%)	
LCC	2 (3.6%)	0 (0%)		2 (3.2%)	0 (0%)	
Altro	1 (1.8%)	1 (4.3%)		1 (1.6%)	1 (6.2%)	
Dimensioni tumore						
T1 (T1a-T1b)	9 (20.0%)	3 (16.7%)	0.1511	9 (18.4%)	3 (21.4%)	0.3189
T2 (T2a-T2b)	20 (44.4%)	11 (61.1%)		27 (55.1%)	4 (28.6%)	
T3	13 (28.9%)	1 (5.5%)		9 (18.4%)	5 (35.7%)	
T4	3 (6.7%)	3 (16.7%)		4 (8.1%)	2 (14.3%)	
Stato linfonodale						
Negativo	16 (39%)	3 (18.8%)	0.2516	15 (34.1%)	4 (30.8%)	0.9111
Positivo	25 (61%)	13 (81.3%)		29 (65.9%)	9 (69.2%)	
Stato di fumatore						
Never smoking	4 (15.4%)	9 (60%)	0.0086	12 (35.3%)	1 (14.3%)	0.2975
Former smoking	21 (80.8%)	5 (33.3%)		21 (61.8%)	5 (71.4%)	
Current smoking	1 (3.8%)	1 (6.7%)		1 (2.9%)	1 (14.3%)	

Tabella V. Correlazioni tra le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti arruolati nello studio e lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras*. *ADC*, adenocarcinoma; *SCC*, carcinoma a cellule squamose; *LCC*, carcinoma a grandi cellule. [§]I valori sono mostrati come *n* (%); ^{*}I valori *p* statisticamente significativi sono indicati in grassetto.

Per entrambi i geni analizzati è stata osservata una correlazione positiva tra la presenza della mutazione e la diagnosi istologica di ADC. Infatti, le mutazioni dei geni *EGFR* e *K-Ras* sono state riscontrate esclusivamente nei pazienti con ADC (*EGFR* 22/54, $p=0.0049$; *K-Ras* 15/54, $p=0.0369$) e in due pazienti con diagnosi, rispettivamente di carcinoma adeno-squamoso e di carcinoma scarsamente differenziato del polmone di cui non è stato possibile definire una chiara diagnosi di ADC, mentre

nessuno dei pazienti con diagnosi di SCC o LCC ha riportato mutazioni nei due geni analizzati (**Tabella V**).

Le mutazioni del gene *EGFR*, inoltre, sono risultate essere statisticamente correlate con l'abitudine al fumo ($p=0.0086$), essendo più frequenti nei pazienti non fumatori (*never smoking*) rispetto ai pazienti fumatori (*current smoking*) o con un passato di fumatore (*former smoking*). Viceversa, le mutazioni del gene *K-Ras* sono più frequenti nei pazienti fumatori o con un passato di fumatore, sebbene questa relazione non sia risultata statisticamente significativa ($p=0.2975$) (**Tabella V**).

4.4 Correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e i profili di espressione di *Let-7g* e *miR-21*

L'analisi delle correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* ha messo in evidenza una relazione statisticamente significativa tra l'espressione di *miR-21* e la presenza di mutazioni a livello dei codoni 12 e 13 del gene *K-Ras* ($p=0.0003$), mentre nessuna relazione è stata osservata tra l'espressione di *miR-21* e *Let-7g* e la presenza di mutazioni a livello del dominio tirosin-chinasico del gene *EGFR* (**Tabella VI**).

Gene	Espressione <i>Let-7g</i> [§]		<i>p</i> [*]	Espressione <i>miR-21</i> [§]		<i>p</i> [*]
	Low	High		Low	High	
<i>Status EGFR</i>						
<i>Wild type</i>	27 (49.1%)	28 (50.9%)	0.8835	27 (49.1%)	28 (50.9%)	0.8039
Mutato	11 (47.8%)	12 (52.2%)		12 (47.8%)	11 (52.2%)	
<i>Status K-Ras</i>						
<i>Wild type</i>	32 (51.6%)	30 (48.4%)	0.4676	38 (61.3%)	24 (38.7%)	0.0003
Mutato	6 (37.5%)	10 (62.5%)		1 (6.2%)	15 (93.8%)	

Tabella VI. Correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e i livelli di espressione di *Let-7g* e *miR-21*. [§]I valori sono mostrati come *n* (%); ^{*}I valori *p* statisticamente significativi sono indicati in grassetto.

L'analisi della varianza ha confermato i risultati dell'analisi categorica mettendo in evidenza come i tumori che presentavano mutazioni a carico del gene *K-Ras* mostrassero livelli di espressione di *miR-21* significativamente più alti (14.237 ± 1.638 , $p < 0.001$) rispetto ai tumori *wild type* (7.316 ± 0.792 , **Figura 11**).

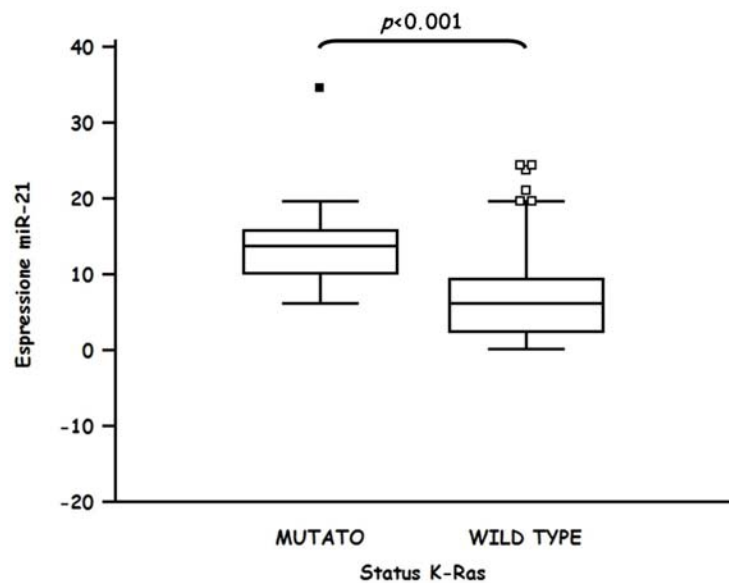


Figura 11. Grafico *Box and Whisker Plot* dell'espressione relativa di *miR-21* mostrata come *fold change* in relazione allo *status* mutazionale del gene *K-Ras*.

5. Analisi di sopravvivenza

Per effettuare l'analisi di sopravvivenza, per ogni paziente è stato calcolato l'intervallo libero da malattia (*DFS, Disease-free survival*), come l'intervallo di tempo intercorso dalla diagnosi alla prima evidenza documentata di ripresa della malattia nelle aree loco-regionali e/o di presenza di metastasi a distanza, e la sopravvivenza globale (*OS, Overall survival*), come il tempo intercorso tra la diagnosi e la morte del paziente a causa della malattia oppure tra la diagnosi e l'ultimo *follow-up*. I valori medi di DFS e di OS sono risultati essere rispettivamente di 27 e di 30 mesi, mentre l'incidenza di mortalità per NSCLC è stata del 26.2% (11/42).

La ripresa della malattia è stata valutata mediante un'analisi tomografica computerizzata e la risposta al trattamento con i TKI dei pazienti con NSCLC è stata classificata in accordo ai criteri RECIST, portando alla suddivisione dei pazienti in due gruppi distinti: il gruppo dei *responders*, costituito dai pazienti che presentavano una risposta completa (CR) o parziale (PR) al trattamento, ed il gruppo dei *non-responders*, costituito dai pazienti che presentavano una malattia stabile (SD) e da quelli che mostravano una progressione della malattia (PD) malgrado il trattamento. Come atteso, l'analisi di sopravvivenza utilizzando il metodo di Kaplan-Meier ha mostrato una

significativa separazione tra le curve di sopravvivenza dei pazienti con un differente ECOG-PS e dei pazienti *responders* e *non-responders* al trattamento con TKI. In particolare, i pazienti con un ECOG-PS pari a 2, che identifica i pazienti incapaci di compiere un'attività lavorativa, ma ancora in grado di accudire a se stessi e di affrontare le cure ambulatoriali, in riposo assoluto per meno del 50% delle ore diurne, hanno mostrato una sopravvivenza nettamente inferiore rispetto ai pazienti con ECOG-PS pari a 0, che identifica i pazienti capaci di condurre una normale vita di relazione, e con ECOG-PS pari a 1, che identifica i pazienti capaci di svolgere un'attività lavorativa leggera e di affrontare le cure ambulatoriali (**Tabella VII, Figura 12**).

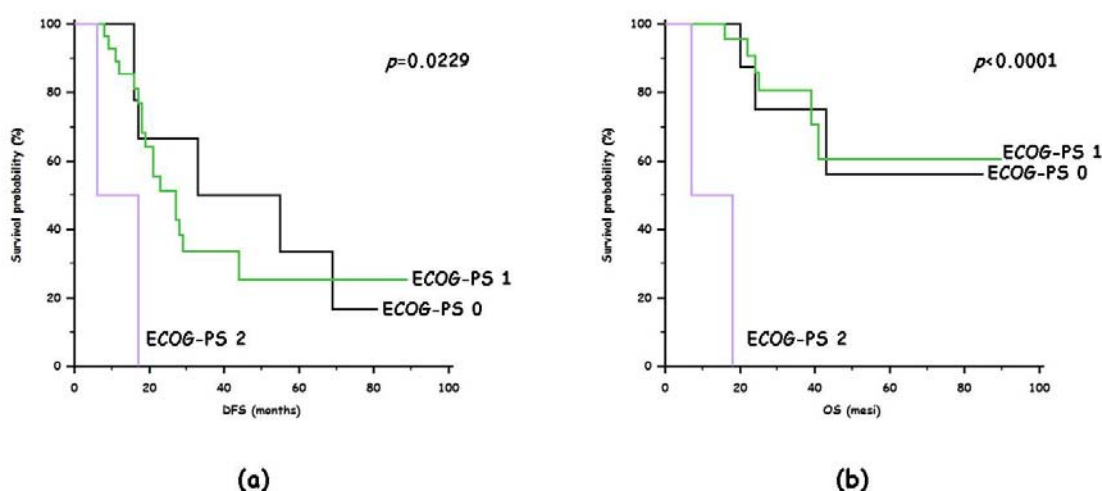


Figura 12. Curve di Kaplan-Meier che comparano (a) la DFS e (b) l'OS dei pazienti con NSCLC stratificati in relazione all'ECOG-PS.

Per quanto riguarda invece l'analisi di sopravvivenza dei pazienti con NSCLC in relazione alla risposta al trattamento con i TKI, il gruppo dei *responders* ha mostrato una sopravvivenza significativamente più alta rispetto al gruppo dei *non-responders* sia in termini di DFS ($p < 0.0001$) che in termini di OS ($p = 0.0006$) (**Tabella VII, Figura 13**). Inoltre, nei pazienti *non-responders* al trattamento con TKI sono stati osservati degli intervalli medi di DFS e OS significativamente più brevi rispetto a quelli dei pazienti *responders*, pari rispettivamente a 17 mesi vs 35 mesi ($p = 0.007$) e 22 mesi vs 40 mesi ($p = 0.003$).

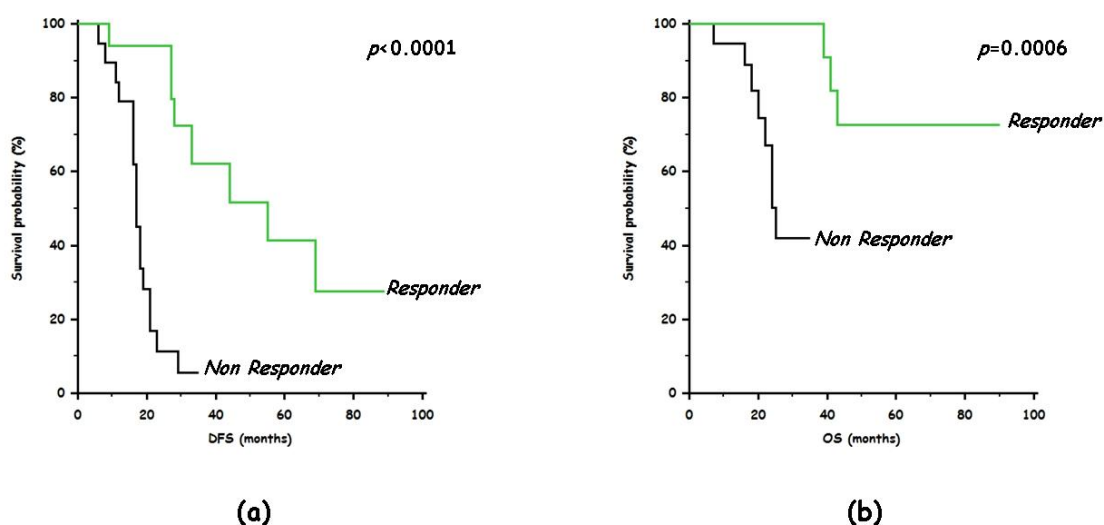


Figura 17. Curve di Kaplan-Meier che comparano (a) la DFS e (b) l'OS dei pazienti con NSCLC stratificati in relazione alla risposta al trattamento con i TKI.

Caratteristica	DFS p^*	OS p^*
ECOG-PS	0.0229	<0.0001
Risposta a TKI	<0.0001	0.0006
<i>EGFR status</i>	0.2679	0.3052
<i>K-Ras status</i>	0.3698	0.9115
Età	0.9714	0.5206
Sesso	0.7413	0.7017
Istologia	0.0914	0.0477
Dimensioni tumore	0.6248	0.6369
Stato linfonodale	0.6735	0.6254
Stato di fumatore	0.3615	0.9529
Espressione <i>Let-7g</i>	0.9286	0.6073
Espressione <i>miR-21</i>	0.4406	0.9393

Tabella VII. Correlazioni tra la DFS e l'OS con le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC analizzati in questo studio. *I valori p statisticamente significativi al *LogRank test* sono indicati in grassetto.

Abbiamo quindi valutato se lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* potesse influenzare la sopravvivenza dei pazienti trattati con TKI. Considerati nel loro insieme i pazienti con NSCLC che presentavano un differente *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* non hanno mostrato differenze significative tra le curve di sopravvivenza dei

pazienti mutati e di quelli *wild type* per i suddetti geni, sia per quanto riguarda l'intervallo libero da malattia che la sopravvivenza globale (**Figura 14**).

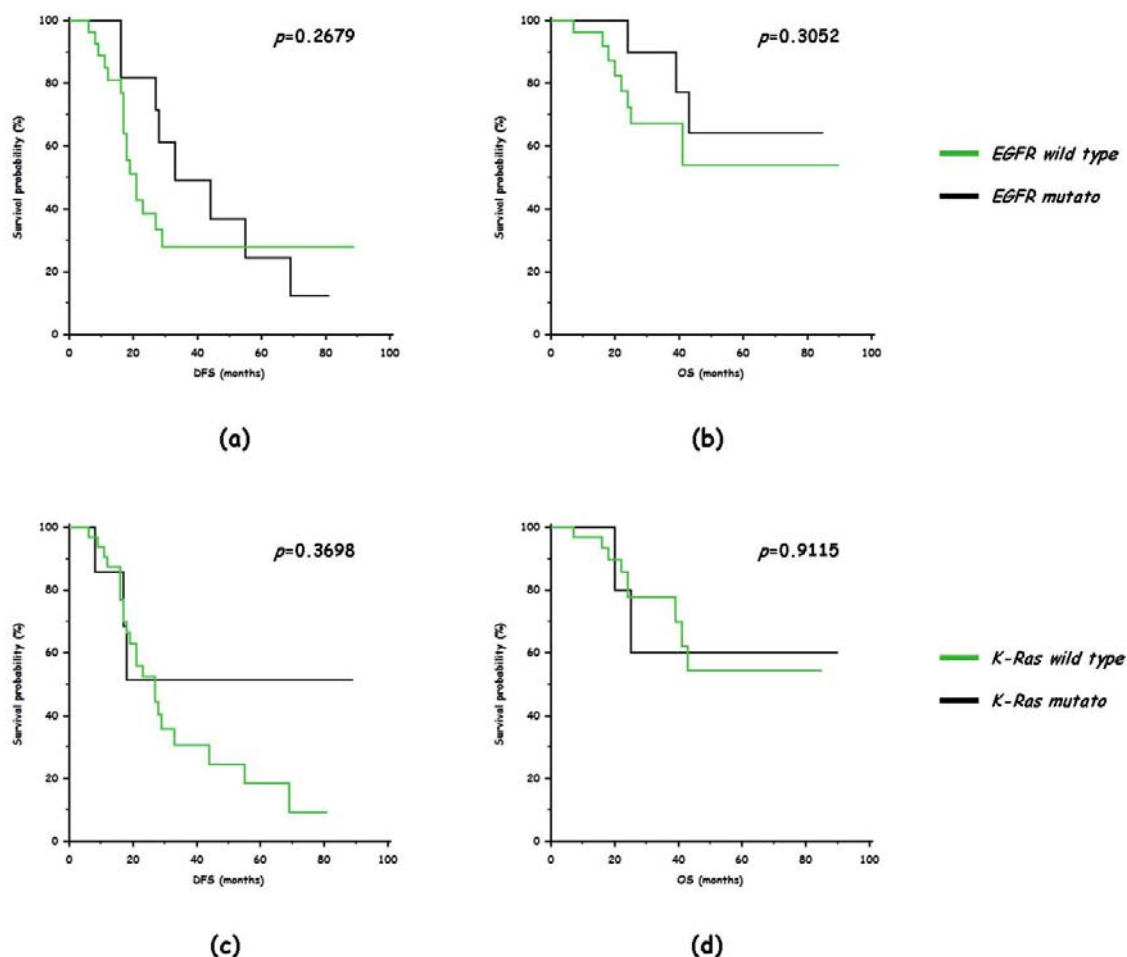


Figura 18. Curve di Kaplan-Meier che comparano **(a, c)** la DFS e **(b, d)** l'OS dei pazienti con NSCLC stratificati in relazione allo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras*.

Tuttavia, mentre non sono state riscontrate differenze significative nella percentuale di pazienti *responders* e *non-responders* per quanto riguarda la frequenza di mutazione del gene *K-Ras* ($p=0.6564$), la risposta al trattamento con TKI è risultata essere significativamente associata alla presenza di mutazioni a carico del gene *EGFR* ($p=0.0025$). Infatti, l'85.7% dei pazienti che presentavano mutazioni del gene *EGFR* hanno risposto al trattamento con TKI, mentre solo 2 dei 14 pazienti che presentavano delle mutazioni a carico di questo gene, di cui uno presentava la mutazione di resistenza primaria p.D770_N771insSVD, non hanno risposto alla terapia (**Tabella VIII**).

Gene	Responders [§]	Non-Responders [§]	<i>p</i> [*]
Status <i>EGFR</i>			
Wild type	7 (29.2%)	17 (70.8%)	0.0025
Mutato	12 (85.7%)	2 (14.3%)	
Status <i>K-Ras</i>			
Wild type	17 (53.1%)	15 (46.9%)	0.6564
Mutato	2 (33.3%)	4 (66.7%)	

Tabella VIII. Correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e la risposta dei pazienti con NSCLC al trattamento con TKI. [§]I valori sono mostrati come *n* (%). ^{*}I valori *p* statisticamente significativi sono indicati in grassetto.

Analizzando le relazioni tra le principali caratteristiche clinico-patologiche, quali il sesso, l'età alla diagnosi, le dimensioni del tumore, lo stato linfonodale e l'abitudine al fumo, e la sopravvivenza dei pazienti con NSCLC, non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative sia per quanto riguarda la DFS che l'OS (**Tabella VII**). Al contrario, l'analisi della sopravvivenza mediante il metodo Kaplan-Meier ha evidenziato una netta separazione delle curve di sopravvivenza dei pazienti con i diversi sottotipi istologici di NSCLC; in particolare, i pazienti che presentavano un ADC hanno mostrato una sopravvivenza globale significativamente superiore rispetto ai pazienti con SCC e LCC ($p=0.0477$, **Tabella VII** e **Figura 15**).

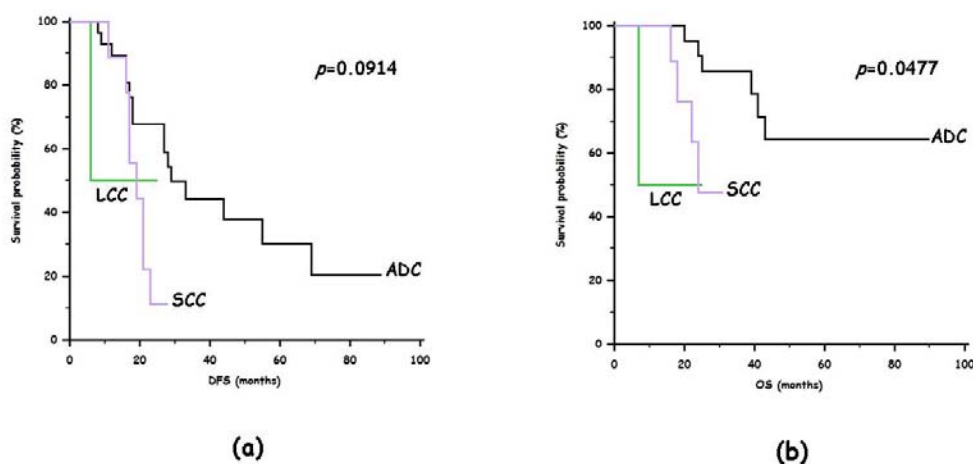


Figura 19. Curve di Kaplan-Meier che comparano (a) la DFS e (b) l'OS dei pazienti con NSCLC stratificati in relazione ai diversi sottotipi istologici.

L'analisi delle curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier relative ai pazienti che presentavano differenze nei livelli di espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* non ha

mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra la sopravvivenza dei pazienti con NSCLC che esprimevano elevati o bassi livelli dei due microRNA analizzati, sia per quanto riguarda la lunghezza dell'intervallo libero da malattia che per la sopravvivenza globale (**Tabella VII, Figura 16**).

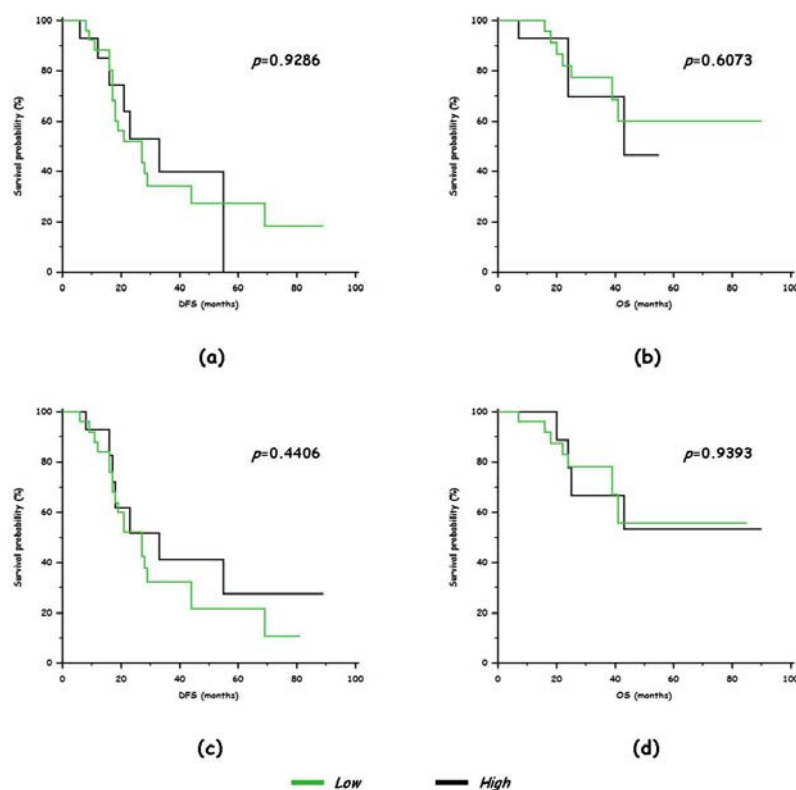


Figura 20. Curve di Kaplan-Meier che comparano la DFS e l'OS nei pazienti con NSCLC stratificati all'espressione di (a, b) *Let-7g* e (c, d) *miR-21*.

Al fine di verificare se l'espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* potesse avere un possibile ruolo nel predire la ricomparsa della malattia, abbiamo ristretto l'analisi di sopravvivenza ai primi 30 mesi del *follow-up*, che corrispondono all'intervallo di tempo in cui tutti i pazienti che progrediscono vanno incontro ad una ricomparsa della malattia documentata da tomografia computerizzata. Confrontando la lunghezza degli intervalli di tempo liberi da malattia e della sopravvivenza globale ristretta ai primi 30 mesi del *follow-up*, abbiamo riscontrato che i pazienti i cui tumori presentavano degli alti livelli di espressione di *Let-7g* o di *miR-21* hanno mostrato una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto ai pazienti i cui tumori esprimevano bassi livelli dei due microRNA sia per quanto riguarda la DFS che l'OS (**Tabella IX**).

Caratteristica	DFS (mesi) [§]	<i>p</i> [*]	OS (mesi) [§]	<i>p</i> [*]
Espressione <i>Let-7g</i>				
<i>Low</i>	20 (17-23)	0.027	21 (18-25)	0.017
<i>High</i>	14 (9-18)		14 (8-19)	
Espressione <i>miR-21</i>				
<i>Low</i>	20 (17-24)	0.004	22 (18-25)	0.006
<i>High</i>	12 (8-16)		13 (8-18)	

Tabella IX. Correlazioni tra la DFS e l'OS dei pazienti con NSCLC con il profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21*. [§]I valori sono mostrati come media (95% CI). ^{*}I valori *p* statisticamente significativi sono indicati in grassetto.

Tale risultato è stato confermato dall'analisi delle curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier relative ai pazienti con NSCLC, che sebbene non sia risultata statisticamente significativa ha messo in evidenza una minore sopravvivenza sia in termini di DFS che di OS per i pazienti i cui tumori presentavano degli alti livelli di espressione di *Let-7g* o di *miR-21* (**Figura 17**).

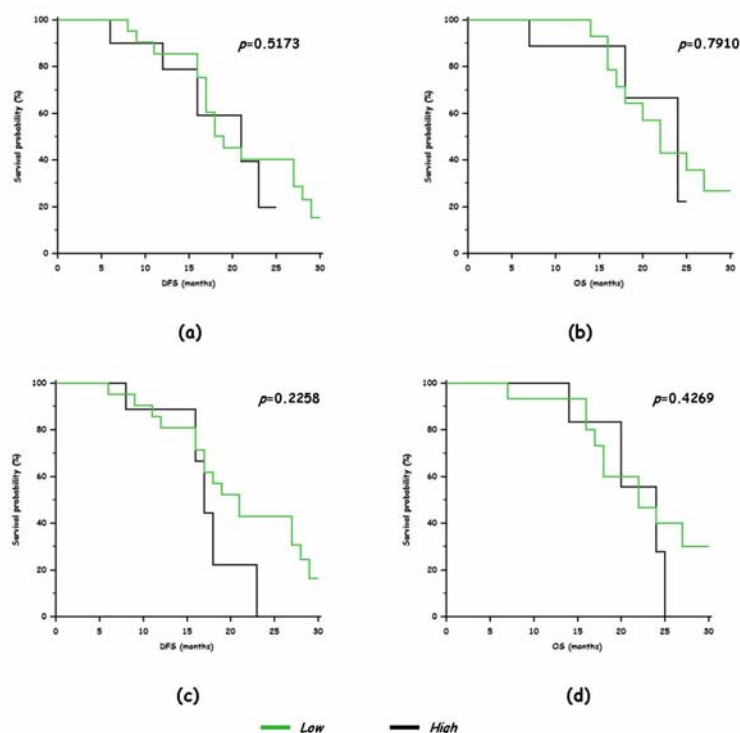


Figura 17. Curve di Kaplan-Meier che comparano la DFS e l'OS nei pazienti con NSCLC stratificati all'espressione di (a, b) *Let-7g* e (c, d) *miR-21* nei primi 30 mesi di *follow-up*.

DISCUSSIONE

Il carcinoma del polmone rappresenta la prima causa di morte per neoplasia nei paesi Occidentali e comprende un gruppo molto eterogeneo di tumori con un largo spettro di morfologie, caratteristiche genetiche, comportamento clinico e risposta alla terapia, di cui i NSCLC rappresentano circa l'80% del totale [1-3].

Negli ultimi decenni la miglior comprensione delle basi molecolari dei carcinomi del polmone, ed in particolare dei NSCLC, ha determinato una vera e propria rivoluzione nel trattamento di questo tipo di neoplasia, tanto che la semplice dicotomia tra SCLC e NSCLC non è più accettabile, in quanto la sottoclassificazione dei NSCLC in adenocarcinoma e carcinoma squamoso del polmone ha importanti implicazioni per quanto riguarda la prognosi e l'approccio terapeutico da adottare. Infatti, attualmente l'individuazione di mutazioni che coinvolgono i geni *EGFR* e *K-Ras*, così come del riarrangiamento *ALK/MLA* riveste un ruolo fondamentale nell'indirizzare il trattamento dei pazienti che presentano tali alterazioni genetiche, in quanto essi possono beneficiare di terapie a bersaglio molecolare che prevedono l'utilizzo di inibitori dell'attività tirosin-chinasica di tali recettori, quali ad esempio il Gefitinib® e Crizotinib® [10-13,31]. Tuttavia, nonostante i notevoli progressi fatti nelle tecniche diagnostiche e nelle modalità di trattamento, nella maggior parte dei pazienti la diagnosi di carcinoma del polmone viene effettuata in una fase avanzata della malattia, con malattia localmente avanzata o con metastasi a distanza (stadio III-IV), ed i pazienti manifestano tassi di ricorrenza elevati anche negli stadi precoci con una sopravvivenza globale a 5 anni dalla diagnosi estremamente bassa, pari soltanto al 15% [1-3]. Pertanto, appare evidente la necessità di individuare per il carcinoma del polmone dei nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi che permettano di stabilire delle diagnosi accurate e precoci e di individuare dei trattamenti terapeutici sempre più personalizzati ed efficaci.

Negli ultimi anni, la scoperta dei microRNA ha messo in evidenza un nuovo e fine meccanismo di regolazione post-trascrizionale che interviene in processi cellulari fondamentali, quali lo sviluppo, il differenziamento, la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la risposta ai segnali extracellulari ed stress cellulari di varia natura, nonché nella patogenesi di numerose patologie umane, incluse quella tumorale [36,37,71-73].

I microRNA sono piccoli RNA non codificanti che riconoscono specifici mRNA *target* e ne regolano l'espressione promuovendo la loro degradazione e/o l'inibizione della loro traduzione a seconda del grado di complementarietà tra la sequenza *seed* del microRNA e la sequenza dei loro mRNA bersaglio. Il valore prognostico e diagnostico dei microRNA è stato riportato in numerosi studi che hanno messo in evidenza come le alterazioni del profilo di espressione dei microRNA siano strettamente correlate all'iniziazione ed alla progressione di numerose neoplasie umane, nell'ambito delle quali essi possono comportarsi sia come oncogeni che come geni oncosoppressori. A tale riguardo, l'identificazione dei microRNA cancro-specifici e dei loro bersagli molecolari rappresenta un passaggio chiave per caratterizzare il ruolo dei microRNA nella tumorigenesi umana e potrebbe essere importante per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici [36,37,76].

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare il profilo di espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* in una serie di 80 pazienti con NSCLC al fine di stabilirne una loro eventuale de-regolazione, di identificare possibili relazioni tra la loro espressione e le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, e di valutarne infine un loro possibile impiego come marcatori diagnostici, prognostici e predittivi per il NSCLC.

La valutazione dell'espressione dei microRNA in pazienti che presentavano diversi sottotipi istologici di NSCLC è stata effettuata mediante *Real-time* PCR a partire da RNA estratto da diverse tipologie di materiale, inclusi tessuti FFPE e preparati citologici, utilizzando delle sonde specifiche che permettono la rivelazione delle forme mature di *Let-7g* e *miR-21*, ma non dei loro precursori. L'analisi di *clustering* gerarchico non supervisionato che utilizzava la distanza euclidea come misura di similarità e l'algoritmo basato sulla distanza media per classificare i campioni analizzati in questo studio, ha generato un dendrogramma in cui è stato possibile identificare due *clusters* principali basati sulla similarità dell'espressione di *miR-21* che permette di discriminare i campioni di tessuto normale con una bassa espressione di *miR-21* dai campioni di NSCLC, caratterizzati invece da un'alta espressione di tale microRNA. A conferma di tale risultato, la valutazione dell'espressione di *miR-21* rispetto ad un controllo endogeno di espressione rappresentato dal microRNA *RNU6B*, ha messo in evidenza un significativo aumento dell'espressione di questo microRNA nei tessuti

tumoriali di NSCLC rispetto ai tessuti polmonari normali. L'up-regolazione di *miR-21* nei tessuti tumorali rispetto ai tessuti normali da noi riscontrata risulta in accordo a quanto osservato precedentemente da altri autori sia in neoplasie polmonari [77,95,99], che in neoplasie di altra natura, quali ad esempio glioblastoma [104], carcinoma epatocellulare [105] ed il carcinoma ovarico [106], suggerendo un chiaro ruolo da oncogene per questo microRNA. Per quanto riguarda invece l'espressione di *Let-7g*, sebbene non siano state riscontrate delle differenze significative tra la sua espressione nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali, i nostri risultati hanno evidenziato una down-regolazione di questo microRNA in accordo a quanto precedentemente riportato in letteratura da altri autori che hanno dimostrato un ruolo importante di questo microRNA nella regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi ipotizzandone un ruolo da oncosoppressore [80,82-84]. La down-regolazione di *Let-7g* osservata nei carcinomi del polmone potrebbe essere spiegata dal fatto che questo microRNA è localizzato a livello del *locus* 3p21-22, una regione che va incontro ad LOH ed altre alterazioni genetiche che si osservano frequentemente e precocemente durante la carcinogenesi dei NSCLC e che sono più frequenti nei carcinomi squamosi rispetto agli adenocarcinomi [107,108].

Dal momento che i microRNA esplicano la loro funzione biologica mediante la regolazione di specifici geni *target* [57,61], per poter attribuire un significato biologico ai dati di espressione osservati per *Let-7g* e *miR-21* abbiamo eseguito un'analisi *in silico* utilizzando dei metodi bio-informatici in grado di predire quali siano i geni che potenzialmente possano rappresentare il bersaglio d'azione di uno specifico microRNA sulla base della complementarietà di sequenza e della conservazione evolutiva del 3'UTR con la regione *seed* del microRNA d'interesse. Introducendo dei criteri di analisi piuttosto stringenti al fine di limitare il più possibile il numero di falsi positivi, tale ricerca ha permesso di identificare 24 potenziali geni bersaglio per *Let-7g* e 26 geni bersaglio per *miR-21*. La classificazione dei geni *target* identificati mediante tale analisi bioinformatica in base alla loro funzione molecolare e al processo biologico nel quale sono coinvolti, ha messo in evidenza come la maggior parte dei geni che sono influenzati dall'espressione di *Let-7g* e *miR-21* intervengano in processi biologici che svolgono un ruolo cruciale nella tumorigenesi, quali l'apoptosi, le vie di trasduzione del segnale, la regolazione del ciclo cellulare, e la riparazione del DNA. In particolare, tra i

geni bersaglio di *Let-7g* particolare interesse nell'ambito della patologia tumorale dei carcinomi polmonari è rivestito dai geni *N-Ras*, *HMGA2*, *ERCC6* e *MAP3K3*.

Diversi studi hanno dimostrato che tutti i membri della famiglia *Let-7* di microRNA, incluso *Let-7g*, agiscono come regolatori negativi dell'espressione degli mRNA sia di *N-Ras* che di *K-Ras* attraverso il legame a siti multipli di legame presenti nella loro 3'UTR, suggerendo un ruolo importante di *Let-7g* nella down-regolazione degli oncogeni della famiglia *Ras* [68]. Johnson e collaboratori hanno inoltre dimostrato che tessuti di carcinoma del polmone che esprimono livelli ridotti di *Let-7g* presentano livelli significativamente elevati di proteina Ras se confrontati con i loro corrispettivi tessuti normali, suggerendo che la regolazione di Ras possa essere uno dei meccanismi principali di *Let-7g* nell'oncogenesi polmonare [80,81]. Takamizawa e collaboratori hanno infine dimostrato che l'over-espressione di *Let-7g* inibisce la crescita di linee cellulari di carcinoma polmone *in vitro*, suggerendo una relazione causale tra espressione di questo microRNA e la crescita cellulare [79].

Le proteine ad alta mobilità di gruppo A (HMGA) sono le principali proteine non istoniche coinvolte nella regolazione della proliferazione e della differenziazione. La proteina HMGA2 è normalmente espressa a bassi livelli nei tessuti adulti, ma traslocazioni cromosomiche che coinvolgono il locus 12q13-15 o la sua over-espressione sono state implicate nella tumorigenesi di diverse neoplasie umane. Il 3'UTR del gene *HMGA2* presenta sette siti di legame per *Let-7g* e la distruzione di tali siti è stata dimostrata essere direttamente correlata alla trasformazione neoplastica. Inoltre, l'espressione di *Let-7g* è inversamente correlata all'espressione di HMGA2 nei NSCLC e l'over-espressione ectopica di *HMGA2* promuove l'instabilità genomica e la tumorigenesi [109]. Il gene *ERCC6* codifica per la proteina ad attività elicastica *Cockayne syndrome complementation group B*, che svolge un ruolo importante in diversi processi cellulari, quali la trascrizione, la traduzione, il rimodellamento della cromatina e la riparazione del DNA, in particolare nella riparazione dei danni indotti al DNA da diversi carcinogeni, incluso il fumo. Recentemente, varianti genetiche del gene *ERCC6* sono state associate ad un rischio più elevato di sviluppare carcinoma del polmone nei fumatori [110]. Il gene *MAP3K3*, infine, codifica per la proteina omonima che regola direttamente la chinasi attivata dagli stress SAPK e il pathway di ERK attivando rispettivamente SEK e MEK1/2 [111]. Per questi ultimi due target putativi di

Let-7g non sono tuttavia presenti in letteratura degli studi che dimostrano un legame causale tra la loro espressione e l'espressione di *Let-7g*.

Per quanto riguarda *miR-21*, i geni bersaglio che dall'analisi di predizione hanno riportato gli *scores* più alti sono stati *WWP1*, che codifica per una proteina ligasi multifunzionale con attività di E3 ubiquitina che regola numerosi processi biologici tra i quali il *trafficking* delle proteine, la loro degradazione e l'apoptosi [112], *MSH2*, che codifica per una delle principali proteine che intervengono nella riparazione dei *mismatch* ed è frequentemente mutato nei carcinomi ereditari colon-rettali non poliposici [113] e *PDCD4* [114]. Diversi studi hanno dimostrato un effetto anti-apoptotico di *miR-21* che si esplica mediante una regolazione diretta da parte di *miR-21* dell'espressione dei geni oncosoppressori *APAF-1* e *PDCD4*. *miR-21* inibendo l'espressione di *PDCD4*, da un lato promuove l'induzione dell'apoptosi e dall'altro determina l'attivazione del *pathway* delle MAPK chinasi sul quale *PDCD4* esercita un'azione inibitrice tramite AP-1. In questo modo, *miR-21* promuove la trasformazione cellulare e l'invasione in diversi sistemi biologici, incluso il carcinoma del polmone, dove la perdita di espressione di *PDCD4* è direttamente correlata agli stadi più avanzati della malattia [91,114].

Successivamente, per meglio caratterizzare il ruolo bio-patologico di *Let-7g* e *miR-21* abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle relazioni tra l'espressione di tali microRNA e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC.

L'analisi statistica non ha evidenziato la presenza di alcuna correlazione statisticamente significativa tra l'espressione relativa di *Let-7g* e *miR-21* e le principali variabili clinico-patologiche dei pazienti, quali l'età alla diagnosi, il sesso, l'abitudine al fumo, i diversi sottotipi istologici di NSCLC o le dimensioni del tumore. In particolare, i dati relativi all'espressione di *miR-21* e l'abitudine al fumo sono in disaccordo a quanto riportato in letteratura da altri autori che hanno dimostrato che i livelli di espressione di *miR-21* sono significativamente più alti nei tumori dei pazienti fumatori rispetto a non fumatori [100]; tuttavia, tale discordanza potrebbe essere dovuta al fatto che il numero di pazienti per i quali disponevamo delle informazioni relative all'abitudine al fumo era troppo basso per raggiungere una significatività statistica.

Nel nostro studio, la valutazione del profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21* non ha mostrato avere un valore diagnostico nel discriminare i diversi sottotipi istologici di

NSCLC, come riportato in lavori più ampi di caratterizzazione del profilo di espressione dei microRNA nei carcinomi polmonari [77,95], sebbene una tendenza alla significatività sia stata osservata per *miR-21*. Nonostante l'assenza di una significatività statistica, dal confronto dell'espressione dei due microRNA analizzati nei due principali sottotipi istologici di NSCLC, l'adenocarcinoma e il carcinoma squamoso del polmone, è stato possibile evidenziare come il rapporto di espressione sia di *Let-7g* che di *miR-21* sia stato sempre a favore dell'adenocarcinoma rispetto al carcinoma squamoso, con entrambi i microRNA analizzati down-regolati nei carcinomi squamosi rispetto agli adenocarcinomi del polmone. Questa osservazione in accordo ai risultati ottenuti da altri autori nei suddetti studi di *profiling* che utilizzavano la metodica dei *microarray* sembrerebbe suggerire un ruolo importante per questi microRNA nella patogenesi dei carcinomi squamosi [77,95]. Inoltre, Landi e collaboratori [95] hanno riportato nel loro lavoro che l'espressione differenziale di *Let-7g* e *miR-21* permetteva di discriminare tra adenocarcinomi e carcinomi squamosi del polmone, ma che tali differenze di espressione per istologia erano altamente significative nei tumori negli stadi più precoci (Stadio I), ma perdevano significatività negli stadi più avanzati (Stadi II-IV), suggerendo che nei tumori più avanzati e meno differenziati l'espressione dei due microRNA perdeva la sua specificità per l'istologia. Nella nostra casistica la quasi totalità dei tumori analizzati rientrano negli stadi avanzati (II-IV), per cui l'assenza di una relazione statisticamente significativa tra le variazioni di espressione *Let-7g* e *miR-21* e i diversi sottotipi istologici di NSCLC potrebbe essere proprio dovuta al fatto che l'espressione dei microRNA perde la specificità per l'istologia nelle fasi avanzate della progressione tumorale o essere semplicemente dovuta alle dimensioni della casistica e al numero ridotto di carcinomi squamosi del polmone analizzati.

Dall'analisi statistica delle relazioni tra l'espressione dei microRNA e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC, è emerso un'interessante relazione tra l'espressione relativa di *Let-7g* e lo *status* linfonodale dei pazienti alla diagnosi, che ha mostrato come la maggioranza dei pazienti con NSCLC che mostravano dei bassi livelli dell'espressione relativa di *Let-7g* presentava linfonodi positivi alla diagnosi, mentre non sono state riscontrate differenze sostanziali nello *status* linfonodale dei pazienti con tumori ad alta espressione di *Let-7g*, suggerendo un ruolo importante di questo microRNA nella diffusione dei NSCLC. A sostegno di

questa ipotesi, l'osservazione che l'induzione ectopica di *Let-7g* in xenograft di NSCLC determina a una significativa riduzione della crescita tumorale e una riduzione della diffusione dei tumori [79].

Data l'importanza che la determinazione delle mutazioni dei geni *EGFR* e *K-Ras* riveste attualmente nel *management* dei pazienti con NSCLC, abbiamo eseguito l'analisi mutazionale per tali geni e correlato lo *status* mutazionale dei pazienti con le principali caratteristiche clinico-patologiche e con i profili di espressione dei microRNA analizzati in questo studio.

Nel nostro studio, la frequenza di mutazione del gene *EGFR* è risultata essere pari al 29.5%, un dato sensibilmente superiore a quanto riportato in letteratura nei pazienti affetti da NSCLC [15,21]. Tale discordanza è dovuta al fatto che molti dei pazienti analizzati in questo studio rientravano in uno studio più ampio in cui i pazienti venivano reclutati in base alla presenza delle mutazioni nei geni *EGFR* al fine di valutarne la risposta al trattamento con i TKI. Tutte le mutazioni del gene *EGFR* identificate in questo studio sono localizzate negli esoni 18-21 del gene *EGFR* codificante per il dominio tirosin-chinasico del recettore, sono state precedentemente descritte nei NSCLC e comprendono sia mutazioni che inducono sensibilità al trattamento con i TKI, quali le delezioni *in frame* del motivo ELREA nell'esone 19 e mutazioni missenso dell'esone 21 (p.L858R), sia mutazioni che sono indicative di una resistenza primaria (p.D770_N771insSVD) o secondaria (p.T790M) al trattamento con i TKI [21-24]. La risposta al trattamento con TKI è risultata essere significativamente associata alla presenza di mutazioni a carico del gene *EGFR*. Infatti, l'85.7% dei pazienti che presentavano mutazioni del gene *EGFR* hanno risposto al trattamento con TKI, mentre solo 2 dei 14 pazienti che presentavano delle mutazioni a carico di questo gene, di cui uno presentava la mutazione di resistenza primaria p.D770_N771insSVD, non hanno risposto alla terapia con TKI.

L'analisi mutazionale del gene *K-Ras* ha evidenziato la presenza di mutazioni a livello dei codoni 12 e 13 di questo gene nel 20.5% dei pazienti analizzati, in accordo alle frequenze di mutazione per questo gene riportate in letteratura nei NSCLC [26,27]. Tutte le mutazioni del gene *K-Ras* identificate in questo studio sono state già descritte, ad eccezione della sostituzione dell'amminoacido glicina in posizione 13 di *K-Ras* con un residuo di prolina (p.G13P), dovuta ad una doppia sostituzione nucleotidica a livello

dei nucleotidi 37 e 38 del gene *K-Ras* (c.37_38GG>CC), che descriviamo qui per la prima volta. Non essendo stata descritta in precedenza, per la mutazione p.G13P abbiamo condotta un'analisi *in silico* con il programma PolyPhen-2 per predire il possibile effetto che tale sostituzione ha sulla funzionalità della proteina. Da tale analisi è emerso che la mutazione p.G13P presenta una probabilità molto elevata di compromettere la funzionalità della proteina K-Ras, essendo localizzata a livello di residui amminoacidici molto conservati anche tra proteine appartenenti a specie animali differenti ed è ipotizzabile che analogamente a mutazioni analoghe osservate a livello di questo codone determini un'attivazione costitutiva della proteina K-Ras [25].

Le mutazioni del gene *EGFR* e del gene *K-Ras* sono risultate essere mutualmente esclusive in accordo a quanto riportato in letteratura [20,21,26]. Quando lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* è stato correlato con le principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da NSCLC arruolati nel nostro studio, l'analisi statistica ha dimostrato un'associazione statisticamente significativa tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* ed il sesso dei pazienti e la diagnosi istologica di NSCLC in accordo a quanto riportato da altri autori [20,21,26]. Infatti, le mutazioni del gene *EGFR* sono state riscontrate più frequentemente nei pazienti di sesso femminile, mentre le mutazioni del gene *K-Ras* sono più diffuse nei pazienti di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile. Al contrario, per entrambi i geni analizzati è stata osservata una correlazione positiva tra la presenza della mutazione e la diagnosi istologica di adenocarcinoma; infatti, tutte le mutazioni dei geni *EGFR* e *K-Ras* identificate in questo studio sono state riscontrate esclusivamente nei pazienti con adenocarcinoma del polmone e in due pazienti con diagnosi, rispettivamente di carcinoma adeno-squamoso e di carcinoma scarsamente differenziato del polmone di cui non è stato possibile definire una chiara diagnosi di adenocarcinoma, mentre nessuno dei pazienti con diagnosi di carcinoma squamoso o carcinoma a grandi cellule del polmone ha riportato mutazioni nei due geni analizzati. Per quanto riguarda le correlazioni tra lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* e l'abitudine al fumo dei pazienti con NSCLC, nel nostro studio abbiamo riscontrato una correlazione negativa tra la presenza delle mutazioni del gene *EGFR* e lo *status* di fumatore, in quanto le mutazioni di questo gene sono risultate essere più frequenti nei pazienti non fumatori rispetto ai pazienti fumatori o con un passato di fumatore. Viceversa, le mutazioni del

gene *K-Ras* sono più frequenti nei pazienti fumatori o con un passato di fumatore, sebbene questa relazione non abbia raggiunto la significatività statistica.

Confrontando il profilo di espressione dei microRNA analizzati in questo studio con lo *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras* non abbiamo evidenziato alcuna relazione statisticamente significativa tra l'espressione di *Let-7g* e la presenza di mutazioni a carico del gene *K-Ras* o a livello del dominio tirosin-chinasico del gene *EGFR*, in accordo a quanto riportato anche da altri autori. L'assenza di differenze statisticamente significative tra l'espressione di *Let-7g* nei NSCLC che presentavano un diverso *status* mutazionale dei geni *EGFR* e *K-Ras*, potrebbe essere dovuto al fatto che l'espressione aberrante di *Let-7g* rappresenta un evento precoce nella carcinogenesi dei NSCLC e che tale alterazione sia mutualmente esclusiva con le mutazioni del gene *K-Ras*. In particolare, è stato ipotizzato un ruolo predominante delle alterazioni del profilo di espressione di *Let-7g* nella carcinogenesi dei carcinomi squamosi del polmone, che, infatti, mostrano dei livelli più bassi di espressione di questo microRNA rispetto agli altri istotipi di NSCLC, e delle mutazioni del gene *K-Ras* negli adenocarcinomi [77,95].

Per quanto riguarda invece *miR-21*, non abbiamo riscontrato delle differenze significative tra il profilo di espressione di questo microRNA e le mutazioni del gene *EGFR*. Al contrario, il profilo di espressione di *miR-21* è risultato essere fortemente correlato alla presenza di mutazioni a livello dei codoni 12 e 13 del gene *K-Ras*, mettendo in evidenza come i tumori che presentavano mutazioni a carico del gene *K-Ras* mostrino livelli di espressione di *miR-21* significativamente più alti rispetto ai tumori *wild type*. Questi risultati sembrerebbero sostenere un'azione sinergica delle alterazioni del profilo di espressione di *miR-21* e delle mutazioni del gene *K-Ras* nel favorire il fenotipo neoplastico dei NSCLC che descriviamo qui per la prima volta. Tale azione sinergica trova un suo fondamento nel *loop* auto-regolatorio esistente tra *miR-21* e *K-Ras*. Infatti, le mutazioni del gene *K-Ras* determinano un'attivazione costitutiva di questa proteina con conseguente attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale intracellulare ed in particolare del *pathway* delle MAPK chinasi, che controllano processi fondamentali per l'iniziazione e la progressione tumorale, quali la proliferazione cellulare, la crescita cellulare, l'apoptosi, il metabolismo, l'angiogenesi, l'invasione e la metastatizzazione [17]. Tra i geni che abbiamo predetto rappresentare un *target* per *miR-21* sono presenti anche i geni *SPRY1* e *SPRY2* che regolano

negativamente il *pathway* Ras/MAPK chinasi, per cui un aumento dell'espressione di *miR-21* determina una riduzione dei livelli di SPRY1 e SPRY2 con conseguente attivazione di questo *pathway* di trasduzione del segnale [115]. Inoltre, l'inibizione di PDCD4 da parte di *miR-21* discussa in precedenza, oltre ad avere un effetto anti-apoptotico rimuove l'effetto inibitorio di PDCD4 su AP-1, che si trova a valle del *pathway* Ras/MAPK chinasi e che favorisce l'espressione di *miR-21*. Questo complesso circuito di regolazione potrebbe giustificare gli alti livelli di espressione di *miR-21* osservato nei tumori di NSCLC che presentano mutazioni a carico del gene *K-Ras*, stabilendo un *loop* positivo tra questi due oncogeni che ha come effetto finale la stimolazione di tutti quei *pathway* che promuovono la proliferazione e la crescita tumorale, nonché la resistenza ai trattamenti farmacologici.

Nell'ultima parte di questo lavoro abbiamo effettuato un'analisi di sopravvivenza al fine di valutare l'esistenza di eventuali correlazioni tra il profilo di espressione di *Let-7g* e *miR-21* e la prognosi dei pazienti con NSCLC. A tale scopo, per ogni paziente è stato calcolato l'intervallo libero da malattia come l'intervallo di tempo intercorso dalla diagnosi alla prima evidenza della ripresa della malattia valutata mediante un'analisi tomografica computerizzata, e la sopravvivenza globale come il tempo intercorso tra la diagnosi e la morte del paziente a causa della malattia oppure tra la diagnosi e l'ultimo *follow-up*. Come atteso, l'analisi di sopravvivenza dei pazienti con NSCLC utilizzando il metodo di Kaplan-Meier ha dimostrato una sopravvivenza significativamente più alta sia in termini di intervallo libero da malattia che di sopravvivenza globale nei pazienti che presentavano una risposta completa o parziale al trattamento con TKI rispetto a quelli presentavano una malattia stabile e che mostravano una progressione della malattia malgrado il trattamento, così come nei pazienti che presentavano un diverso *performance status* definito in base all'ECOG. Analizzando invece le relazioni tra le principali caratteristiche clinico-patologiche e la sopravvivenza dei pazienti con NSCLC, non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative sia per quanto riguarda l'intervallo libero da malattia che la sopravvivenza globale, mentre una relazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra la sopravvivenza globale dei pazienti con NSCLC e il differente sottotipo istologico. Infatti, l'analisi della sopravvivenza ha infatti evidenziato una netta separazione delle curve di sopravvivenza dei pazienti con i diversi sottotipi istologici di NSCLC, con i pazienti che presentavano

un adenocarcinoma del polmone che hanno mostrato una sopravvivenza globale significativamente superiore rispetto ai pazienti con carcinoma a cellule squamose e con carcinoma a grandi cellule del polmone. L'analisi delle curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier relative ai pazienti che presentavano differenze nei livelli di espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra la sopravvivenza dei pazienti con NSCLC che esprimevano elevati o bassi livelli dei due microRNA analizzati, sia per quanto riguarda la lunghezza dell'intervallo libero da malattia che per la sopravvivenza globale. Questo risultato risulta in contrasto con i dati riportati in letteratura che sostengono un ruolo prognostico negativo sia per *Let-7g*, la cui down-regolazione è stata associata ad una ridotta sopravvivenza globale nei pazienti con NSCLC indipendentemente dallo stadio [80,81], che per *miR-21*, la cui over-espressione è stata associata ad una scarsa prognosi indipendentemente dallo stadio TNM e dallo stato dei linfonodi [98-100], potrebbero essere dovuti all'esiguità del numero di pazienti di cui avevamo a disposizione i dati clinici. Tuttavia, dal momento che le curve di sopravvivenza apparivano differenti nella prima parte del *follow-up* abbiamo ristretto la nostra analisi ai primi 30 mesi del *follow-up*, che corrispondono all'intervallo di tempo in cui tutti i pazienti che progrediscono vanno incontro ad una ricomparsa della malattia documentata da tomografia computerizzata, al fine di verificare se l'espressione dei microRNA *Let-7g* e *miR-21* potesse avere un possibile ruolo nel predire la ricomparsa della malattia o sulla sopravvivenza globale. Il confronto degli intervalli di tempo liberi da malattia e della sopravvivenza globale ristretta ai primi trenta mesi del *follow-up* ha dimostrato che i pazienti i cui tumori presentavano degli alti livelli di espressione di *Let-7g* o di *miR-21* hanno mostrato una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto ai pazienti i cui tumori esprimevano bassi livelli dei due microRNA. Questi risultati potrebbero avere un ruolo importante nel *management* e nella caratterizzazione dei profili biomolecolari dei pazienti con NSCLC, in quanto la concomitante valutazione delle mutazioni del gene *K-Ras* e dei livelli di espressione di *Let-7g* e di *miR-21* potrebbe rappresentare dei validi marcatori prognostici e predittivi nella definizione dello *status* dei pazienti con NSCLC, portando all'identificazione di quei pazienti che indipendentemente dallo stadio e dallo stato linfonodale presentano tumori con un fenotipo più aggressivo e una prognosi più infausta e che potrebbero beneficiare di trattamenti più aggressivi e mirati.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Robbins & Cotran. Le basi patologiche delle malattie (VI Edizione). Padova, Piccin Editore, 2000.
- [2] Travis WD, Brambilla E, Muller-Hemerlink HK, Harris CC. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press, 2004.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012;62(1):10-29.
- [4] Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. Mayo Clin Proc 2008;83:355-367.
- [5] Selvaggi G, Scagliotti GV. Histologic subtype in NSCLC: does it matter? Oncology 2009;23(13):1133-1140.
- [6] Schiller JH. Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer. Oncology 2001;61:3-13.
- [7] Triano LR, Deshpande H, Gettinger SN. Management of patients with advanced non-small cell lung cancer: current and emerging options. Drugs 2010;70(2):167-179.
- [8] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelwitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011;6(2):244-285.
- [9] Bonadonna G, Robustelli Della Cuna G, Valagussa P. Medicina oncologica (VIII Edizione). Milano, Elsevier Masson, 2007.
- [10] Saintigny P, Burger JA. Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. Discov Med 2012;13(71):287-297.

- [11] Dempke WC, Suto T, Reck M. Targeted therapies for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;67(3):257-274.
- [12] Kotteas EA, Charpidou AG, Syrigos KN. Targeted therapy for non small cell lung cancer: focusing on angiogenesis, the epidermal growth factor receptor and multikinase inhibitors. *Anticancer Drugs* 2010;21(2):151-168.
- [13] Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, Santini D, Bazan V, Colucci G, Gebbia N, Russo A. Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev* 2010;36:S21-S29.
- [14] Dacic S. Molecular diagnostics of lung carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(5):622-629.
- [15] Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12(2):175-180.
- [16] Gazdar AF, Minna JD. Deregulated EGFR signalling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops. *Cancer Prevention Res* 2008;1:156-160.
- [17] Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 2008;60:261-310.
- [18] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501
- [19] Gazdar AF. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(1):37-48.
- [20] Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol* 2008;21(Supplement 2):S16-S22.
- [21] Yatabe Y, Mitsudomi T. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers. *Pathol Int* 2007;57:233-244.
- [22] Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):352-366.
- [23] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, Mitsudomi T. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in

- patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006;12:5764-5769.
- [24] Xu Y, Liu H, Chen J, Zhou Q. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. *Cancer Biol Ther* 2010;9(8):572-582.
- [25] Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756(2):81-82.
- [26] Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(2):201-205.
- [27] Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, Li J, Chen Q. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010;69(3):272-278.
- [28] Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(1):55-62.
- [29] Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;354(24):2619-2621.
- [30] Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448(7153):561-566.
- [31] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, Choi HG, Kim J, Chiang D, Thomas R, Lee J, Richards WG, Sugarbaker DJ, Ducko C, Lindeman N, Marcoux JP, Engelman JA, Gray NS, Lee C, Meyerson M, Jänne PA. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4275-4283.
- [32] Ou SH, Bazhenova L, Camidge DR, Solomon BJ, Herman J, Kain T, Bang YJ, Kwak EL, Shaw AT, Salgia R, Maki RG, Clark JW, Wilner KD, Iafrate AJ. Rapid and dramatic radiographic and clinical response to an ALK inhibitor (crizotinib, PF02341066) in an ALK translocation-positive patient with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(12):2044-2046.

- [33] Lawrence RE, Salgia R. MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer. *Cell Adh Migr* 2010;4(1):146-152.
- [34] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signalling. *Science* 2007;316(5827):1039-1043.
- [35] Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, Del Grammastro M, Sciarrotta MG, Buttitta F, Incarbone M, Toschi L, Finocchiaro G, Destro A, Terracciano L, Roncalli M, Alloisio M, Santoro A, Varella-Garcia M. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27(10):1667-1774.
- [36] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5848-5856.
- [37] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(2):126-139.
- [38] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 2011;67(1):129-139.
- [39] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-854.
- [40] Van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:644-656.
- [41] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350-355.
- [42] Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007;8:166-186.
- [43] Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med* 2008;12(5B):1811-1819.
- [44] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011;91(3):827-887.
- [45] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 2002;21:4663-4670.

- [46] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14(10A):1902-1910.
- [47] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010;222(3):540-545.
- [48] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-4060.
- [49] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-1101.
- [50] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
- [51] Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. *Curr Opin Mol Ther* 2009;11(2):189-199.
- [52] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-235.
- [53] Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 2011; 676:3-22.
- [54] Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303:95-98.
- [55] Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 2007;131(6):1097-1108.
- [56] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
- [57] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation. *Nature Rev Genet* 2002;5:522-531.
- [58] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102-114.
- [59] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-1934.

- [60] Bruno IG, Karam R, Huang L, Bhardwaj A, Lou CH, Shum EY, Song HW, Corbett MA, Gifford WD, Gecz J, Pfaff SL, Wilkinson MF. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell* 2011; 42:500-510.
- [61] Alexiou P, Maragkakis M, Papadopoulos GL, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* 2009;25(23):3049-3055.
- [62] Lhakhang TW, Chaudhry MA. Current approaches to micro-RNA analysis and target gene prediction. *J Appl Genet* 2012;53(2):149-518.
- [63] Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 2009;7:18.
- [64] Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 2010;148(4):381-392.
- [65] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435:839-843.
- [66] Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2422-2427.
- [67] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11:597-610.
- [68] Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zeltermann D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008;68:8535-8540.
- [69] Mishra PJ, Humeniuk R, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13513-13518.
- [70] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16

- at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-15529.
- [71] Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009;55(4):623-631.
- [72] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009;60:167-179.
- [73] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:199-227.
- [74] Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011;223(2):102-115.
- [75] Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007;6:1001-1005.
- [76] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012;4(3):143-159.
- [77] Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2257-2261.
- [78] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-689.
- [79] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64(11):3753-3756.
- [80] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005;120(5):635-647.
- [81] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 2007;67:7713-7722.

- [82] Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3903-3908.
- [83] Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 2008;18(10):505-16.
- [84] Osada H, Takahashi T. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci* 2011;102(1):9-17.
- [85] Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer* 2010;103(8):1144-1148.
- [86] Cherni I, Weiss GJ. miRNAs in lung cancer: large roles for small players. *Future Oncol* 2011;7(9):1045-1055.
- [87] Leidinger P, Keller A, Meese E. MicroRNAs - Important Molecules in Lung Cancer Research. *Front Genet* 2011;2:104.
- [88] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005;65:9628-9632.
- [89] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008;27(31):4373-4379.
- [90] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang GH. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 2010;411(11-12):846-852.
- [91] Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008;18(3):350-359.
- [92] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-198.
- [93] Du L, Schageman JJ, IrnovGirard L, Hammond SM, Minna JD, Gazdar AF, Pertsemlidis A. MicroRNA expression distinguishes SCLC from NSCLC lung

- tumor cells and suggests a possible pathological relationship between SCLCs and NSCLCs. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:75.
- [94] Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27:2030-2037.
- [95] Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, Rubagotti M, Goldstein AM, Linnoila I, Marincola FM, Tucker MA, Bertazzi PA, Pesatori AC, Caporaso NE, McShane LM, Wang E. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:430-441.
- [96] Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, Cheng CL, Yu CJ, Lee YC, Chen HS, Su TJ, Chiang CC, Li HN, Hong QS, Su HY, Chen CC, Chen WJ, Liu CC, Chan WK, Chen WJ, Li KC, Chen JJ, Yang PC. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008;13:48-57.
- [97] Raponi M, Dossey L, Jatkoa T, Wu X, Chen G, Fan H, Beer DG. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 2009;69:5776-6783.
- [98] Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem* 2008;54(10):1696-1704.
- [99] Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, Shu Y. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother* 2010;64(6):399-408.
- [100] Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, Harris CC. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12085-12090.
- [101] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankee A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo

- M, Condorelli G, Croce CM. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009;16:498-509.
- [102] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:5463-5467.
- [103] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998;281:363-365.
- [104] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029-6033.
- [105] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647-658.
- [106] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67:8699-8707.
- [107] Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Sugio K, Yasumoto K, Sugimachi K, Gazdar AF. Loss of heterozygosity at 3p in non-small cell lung cancer and its prognostic implication. *Clin Cancer Res* 1996;2(7):1185-1189.
- [108] Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 2002;21(45):6915-6935.
- [109] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the *HMGA2* oncogene. *Genes Dev* 2007;21(9):1025-1030.
- [110] Lin Z, Zhang X, Tuo J, Guo Y, Green B, Chan CC, Tan W, Huang Y, Ling W, Kadlubar FF, Lin D, Ning B. A variant of the Cockayne syndrome B gene ERCC6 confers risk of lung cancer. *Hum Mutat* 2008;29(1):113-122.
- [111] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802(4):396-405.
- [112] Zhi X, Chen C. WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(9):1425-1434.
- [113] Olaussen KA, Planchard D, Adam J, Soria JC. DNA repair pathways and non-small cell lung cancer: clinical perspectives. *Bull Cancer* 2011;98(3):305-322.

- [114] Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008;27(31):4373-4379.
- [115] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 2010;18(3):282-293.

....E adesso viene la parte più difficile....i **RINGRAZIAMENTI!!!**

Alla fine di un percorso così lungo e probabilmente della mia parentesi di "vita pisana" ci sono molte persone che sento di dover ringraziare...

Innanzitutto ringrazio la Prof.ssa Gabriella Fontanini e il Prof. Fulvio Basolo per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro e di avvicinarmi al mondo della diagnostica molecolare...

Un Grazie particolare lo rivolgo alla Dr.ssa Laura Boldrini per la lettura critica di questo lavoro, per la sua disponibilità ed i suoi preziosi consigli...

Ringrazio il Dr. Federico Cappuzzo e la Dr.ssa Armida D'Incecco per aver pazientemente raccolto tutte le informazioni di follow-up e per avermi dato la possibilità di dare una valenza clinica al mio lavoro di tesi...

Ringrazio tutti i patologi della "stanza dei cervelli"...Clara, Greta, Liborio, e soprattutto Agnese per la sua estrema disponibilità nel selezionare i casi che hanno permesso la realizzazione di questo progetto...

Grazie a Serena, Cristina ed Alice per essere state sempre puntuali e pazienti di fronte alle mie richieste di sezioni in bianco, ma soprattutto per tutti i "Buongiornoooooo!!!" e i "caffè dei poveri" che mi hanno regalato...

Ringrazio tutti i miei colleghi biologi con i quali ho condiviso le difficoltà quotidiane degli ultimi anni, ma soprattutto le piccole e grandi soddisfazioni per i risultati ottenuti ...Riccardo, Cristiana, Elisa, Mirella, e soprattutto Nicla: grazie per essermi stata così vicina in quest'ultimo periodo e per tutti i confronti intellettuali e umani che abbiamo avuto in questi anni...a volte accesi, ma sempre sinceri!

Grazie a Celeste, Elena, Michele, Susanna, Veronica e Wioletta che hanno condiviso con me questa avventura della Specializzazione...Siamo arrivati alla fine che ahimè è solo l'inizio!!!

Grazie agli amici di sempre ed a quelli "nuovi" e tutte le persone che hanno saputo andare oltre la superficie...Grazie per aver reso tutti i miei giorni speciali e indimenticabili e per tutto quello che di bello mi hanno donato....

Infinite Grazie ad Emanuela, una persona e un'amica insostituibile che mi ha accompagnato in tutti questi anni di "vita pisana" aiutandomi a crescere e a superare con serenità tutti gli ostacoli...

...Ma il Grazie più grande va alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuta e anche "sopportata" soprattutto in questi ultimi mesi di un anno che è stato così difficile per tutti noi e soprattutto per me...sperando che dopo tante tempeste torni finalmente il sereno....A Babbo e Mamma...per essere stati sempre presenti nella mia vita anche a tanti chilometri di distanza e per tutti i loro preziosi insegnamenti che mi hanno fatto diventare la persona "speciale" che sono oggi...Spero di continuare a rendervi sempre orgogliosi di me...A Valeria che mi è sempre stata vicina e che non ha mai smesso di provare a convincermi che posso davvero crederci in me stessa e di ripetermi "Duc in Altum!"...A Roberta...la mia (anzi la nostra!!) stellina...per la sua dolcezza e la sua innata saggezza...A Mario per essere stato sempre presente nella vita di tutti noi...Alla piccola Giada che con un suo sorrisino ha cambiato il corso di tanti miei giorni bui...Grazie per aver reso le nostre vite così speciali e per averci fatto diventare delle persone migliori!!!